РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА
Том 108, № 8, 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

Экспериментальные статьи

Роль NO-синтазы в инфаркт-лимитирующем эффекте нормобарической гипоксии
Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная, А. С. Семенцов, И. А. Деркачев, С. В. Гусакова, Akpay Sarybaev 933

Оценка паракринных эффектов кондиционированной среды в ходе ее перекрестного добавления при моделировании взаимодействий в морфофункциональной системе “кондуит–артерия”
А. В. Фролов, Д. К. Шишкова, В. Е. Маркова, М. Ю. Синицкий, А. В. Синицкая, А. О. Поддубняк, А. Ю. Каноныкина, Н. И. Загородников, Е. В. Григорьев, А. Г. Кутихин 940

Мозг как адаптивный фильтр: стационарный слуховой ответ на аудиостимулы на основе бинауральных биений в процессе дневного сна человека
Д. Е. Шумов, Д. С. Свешников, Е. Б. Якунина, З. В. Бакаева, О. В. Манкаева, В. Б. Дорохов 957

Влияние блокады V_{1a}-рецепторов на осморегулирующую функцию почек у гипертиреоидных крыс с различным уровнем вазопрессина в крови
П. Д. Правикова, Л. Н. Иванова 970

Исследование эффектов индуктора шаперонов U133 на временные характеристики цикла бодрствование–сон и пространственную память
И. В. Екимова, Н. С. Курмазов, М. Б. Пази, М. В. Чернышев, С. Г. Полоник, Ю. Ф. Пастухов 984

Исследование нейродегенеративных изменений в структурной и ультраструктурной организации пириформной коры у трансгенных мышей линии 5XFAD
Н. Л. Туманова, Д. С. Васильев, Н. М. Дубровская, Н. Н. Наливаева 997

Меланокортиновые рецепторы 1-го типа в гипоталамусе мышей в норме и при диета-индуцированном ожирении
Е. В. Михайлова, К. В. Деркач, А. О. Шпаков, И. В. Романова 1015

Эффективность различных доз метформина для восстановления метаболических показателей и гормонального статуса у самцов крыс с ограничением грудного вскармливания
К. В. Деркач, В. М. Бондарева, Т. С. Шарова, А. О. Шпаков 1028

Реакция вертикальной позы человека на одиночные звуковые сигналы разного эмоционального содержания
О. П. Тимофеева, И. Г. Андреева 1042

Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова
Правила для авторов (2022 г.) 1058

CONTENTS

Experimental Articles

The Role of NO-Synthase in the Infarct-Limiting Effect of Normobaric Hypoxia
L. N. Maslov, N. V. Naryzhnaya, A. S. Sementsov, I. A. Derkachev, S. V. Gusakova, and Akpay Sarybaev 933

Paracrine Effects of Conditioned Medium during Its Cross-Addition to Arterial and Venous Endothelial Cells
A. V. Frolov, D. K. Shishkova, V. E. Markova, M. Yu. Sinitsky, A. V. Sinitskaya, A. O. Poddubnyak, A. Yu. Kanonykina, N. I. Zagorodnikov, E. V. Grigoriev, and A. G. Kutikhin 940

The Brain as an Adaptive Filter: Auditory Steady State Response to Sound Stimuli Containing Binaural Beats during Human Nap
D. E. Shumov, D. S. Sveshnikov, E. B. Yakunina, Z. V. Bakaeva, O. V. Mankaeva, and V. B. Dorokhov 957

Effect of V_{1a}-Receptor Blockade on Renal Osmoregulatory Function in L-Thyroxine-Induced Hyperthyroid Rats with Different Blood Vasopressin Levels
P. D. Pravikova and L. N. Ivanova 970

Study of the Effects of the Chaperone Inducer U133 on the Temporal Characteristics of the Wake–Sleep Cycle and Spatial Memory
I. V. Ekimova, N. S. Kurmazov, M. B. Pazi, M. V. Chernyshev, S. G. Polonik, and Yu. F. Pastukhov 984

Neurodegenerative Changes in the Structural and Ultrastructural Organization in the Pyriform Cortex of 5xFAD Transgenic Mice
N. L. Tumanova, D. S. Vasilev, N. M. Dubrovskaya, and N. N. Nalivaeva 997

Melanocortin 1 Receptors in the Hypothalamus of Mice within the Norm and in Diet-Induced Obesity
E. V. Mikhailova, K. V. Derkach, A. O. Shpakov, and I. V. Romanova 1015

Effectiveness of Various Metformin Doses for the Restoration of Metabolic Indices and Hormonal Status in Early Weaned Male Rats
K. V. Derkach, V. M. Bondareva, T. S. Sharova, and A. O. Shpakov 1028

Human Postural Responses to Single Sound Signals with Different Emotional Content
O. P. Timofeeva and I. G. Andreeva 1042

Rules for Authors. 2022 1058

EDN: GPSPIF
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 8, с. 933–939

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ NO-СИНТАЗЫ В ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩЕМ ЭФФЕКТЕ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

© 2022 г. Л. Н. Маслов[1], Н. В. Нарыжная[1], А. С. Семенцов[1], И. А. Деркачев[1, *], С. В. Гусакова[1], Akpay Sarybaev[2, 3]

[1]Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия
[2]Department of Mountain and Sleep Medicine and Pulmonary Hypertension, National Center of Cardiology and Internal Medicine, Bishkek, Kyrgyzstan
[3]Kyrgyz-Indian Mountain Biomedical Research Center, Bishkek, Kyrgyzstan
**E-mail: vanya.derkachev@mail.ru*

Поступила в редакцию 25.05.2022 г.
После доработки 12.07.2022 г.
Принята к публикации 19.07.2022 г.

Исследование было выполнено на крысах-самцах линии Вистар. Животные были случайным образом разделены на группы нормоксического контроля и группы, подвергшиеся кратковременной нормобарической гипоксии (НГ). НГ моделировали, используя 6 последовательных циклов гипоксии–реоксигенации: нормобарическая гипоксия (10 мин) и реоксигенация (10 мин). У всех животных воспроизводили коронарооккклюзию (45 мин) путем наложения лигатуры на левую коронарную артерию и реперфузию (2 ч) с помощью удаления лигатуры. Перед моделированием коронарооккклюзии животным вводили следующие фармакологические агенты: ингибитор всех изоформ NO-синтазы L-NAME в дозе 10 мг/кг внутривенно за 15 мин до НГ или за 10 мин до коронарооккклюзии; ингибитор индуцибельной NO-синтазы (iNOS) S-метилтиомочевина в дозе 3 мг/кг внутрибрюшинно за 10 мин до коронарооккклюзии; ингибитор нейрональной NO-синтазы (nNOS) 7-нитроиндазол в дозе 50 мг/кг внутривенно за 10 мин до коронарооккклюзии; донор NO диэтилентриамин внутривенно в дозе 2 мг/кг (инфузия в течение 5 мин) за один час до коронарооккклюзии. Установлено, что L-NAME и S-метилтиомочевина полностью устраняют инфаркт-лимитирующий эффект НГ. Диэтилентриамин повышал устойчивость сердца к ишемии/реперфузии у крыс нормоксического контроля. Установлено, что iNOS играет важную роль в реализации кардиопротекторного эффекта НГ.

Ключевые слова: сердце, ишемия, реперфузия, нормобарическая гипоксия, NO-синтаза

DOI: 10.31857/S0869813922080040

Известно, что свободный радикал оксида азота ($NO^{\bullet}$) участвует в отсроченном кардиопротекторном эффекте ишемического прекондиционирования [1] и в инфаркт-лимитирующем эффекте хронической нормобарической гипоксии (НГ) [2]. Доноры NO повышают устойчивость сердца к ишемии/реперфузии (И/Р) [3]. Оставалось неизвестным, может ли NO участвовать в кардиопротекторном эффекте кратковременной нормобарической гипоксии/реоксигенации.

Целью данной работы явилось изучение роли изоформ NO-синтазы в инфаркт-лимитирующем эффекте кратковременной нормобарической гипоксии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было выполнено на 154 крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. Все процедуры регулировались Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованных Национальными институтами здравоохранения США (публикация NIH № 85-23, пересмотренная в 1996 г.). Этический комитет НИИ кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра одобрил данное исследование (протокол № 207 от 23 декабря 2020 г.).

Животные были разделены на 11 групп по 14 крыс в каждой. Крыс 1-й, 2-й, 3-й, 4-й, 5-й и 6-й групп (групп нормоксического контроля) содержали в стандартных условиях вивария. Животных 7-й, 8-й, 9-й, 10-й и 11-й групп (опытных групп) подвергали кратковременной НГ, используя 6 последовательных циклов гипоксии–реоксигенации: НГ (10 мин) и реоксигенация (10 мин). Гипоксию осуществляли, помещая животных в герметичный сосуд объемом 3.3 л, внутри которого формировали воздушную среду с пониженным содержанием кислорода (8% O_2, 0.9% CO_2 и 91.1% N_2). Затем следовал 10-минутный сеанс реоксигенации (21% O_2). Газовый состав воздуха определяли с помощью газоанализатора Stat Profile M (Nova Biomedical Corporation, Waltham, США). Общая продолжительность НГ составляла 2 ч. Через 30 мин после НГ выполняли коронароокклюзию.

Всех животных перед началом хирургических манипуляций наркотизировали введением α-хлоралозы (100 мг/кг, внутрибрюшинно) и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких SAR-830 Series (CWE Inc., США). Перед моделированием коронароокклюзии животным вводили следующие фармакологические агенты: 1-я группа – внутривенно 0.9%-ный раствор NaCl (1 мл/кг) за 10 мин до коронароокклюзии; 2-я группа – внутривенно 20%-ный раствор гидроксипропил-β-циклодекстрина (1 мл/кг) за 10 мин до коронароокклюзии; 3-я группа – ингибитор всех изоформ NO-синтазы N-ω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) в дозе 10 мг/кг внутривенно за 10 мин до коронароокклюзии [5]; 4-я и 10-я группы – ингибитор индуцибельной NO-синтазы (iNOS) S-метилтиомочевины сульфат в дозе 3 мг/кг внутрибрюшинно за 10 мин до коронароокклюзии [6]; 5-я и 11-я группы – ингибитор нейрональной NO-синтазы (nNOS) 7-нитроиндазол в дозе 50 мг/кг внутривенно [5]. Животным 6-й группы внутривенно вводили донор NO диэтилентриамин (Diethylenetriamine/nitric oxide, DETA/NO) в дозе 2 мг/кг (инфузия в течение 5 мин) за один час до коронароокклюзии [3]. Крысам 8-й группы внутривенно вводили L-NAME (10 мг/кг) за 15 мин до НГ. Животным 9-й группы внутривенно вводили L-NAME (10 мг/кг) после НГ за 10 мин до коронароокклюзии.

L-NAME, S-метилтиомочевина, 7-нитроиндазол, DETA/NO были закуплены в компании Sigma-Aldrich (St. Louis, США). 7-нитроиндазол первоначально растворяли в 0.1 мл диметилсульфоксида (DMSO), а затем – в 0.9 мл 20%-ного раствора гидроксипропил-β-циклодекстрина (Tocris Bioscience, Bristol, Великобритания); L-NAME, S-метилтиомочевину, DETA/NO растворяли в 0.9%-ном растворе NaCl. Все растворы готовили немедленно перед использованием. В связи с тем, что часть препаратов растворяли в 0.9%-ном NaCl, а часть – в 0.9 мл 20%-ного гидроксипропил-β-циклодекстрина, были сформированы две контрольные группы, которым вводили данные растворители.

Регистрацию артериального давления осуществляли с помощью датчика давления SS13L (BiopacSystem Inc., США), сопряженного с аппаратом MP35 (BiopacSystemInc., Goleta, США). Измерение артериального давления осуществляли с помощью канюлирования правой сонной артерии. Для этого в сонную артерию вводили канюлю, подключенную к датчику давления SS13L. Прибор MP35 использовался и для регистрации ЭКГ.

Для выполнения коронарооккклюзии вскрывали грудную клетку, сердце освобождали от перикарда и выводили за пределы грудной клетки наружу. Затем накладывали лигатуру на левую коронарную артерию в ее верхней части на 45 мин. Реперфузия осуществлялась путем снятия лигатуры. Длительность реперфузии составляла 2 ч.

Для определения размера инфаркта сердце извлекали, канюлировали аорту, промывали физиологическим раствором, затем вновь накладывали лигатуру и вводили 5%-ный раствор перманганата калия для отделения зоны гипоперфузии (зоны риска) от интактного миокарда. После удаления перманганата калия левый желудочек рассекали на срезы толщиной 1 мм, которые окрашивали в 1%-ном растворе 2,3,5-трифенилтетразолия при 37°C в течение 30 мин и фиксировали в течение 24 ч в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Готовые срезы сканировали на сканере Scanjet G2710, планиметрически определяя размеры зон некроза и зон риска (ишемии) с помощью программы Ellipse 2.02 (ViDiTo, Чешская республика). Величину инфаркта выражали процентным соотношением площади зоны инфаркта к зоне риска (ЗИ/ЗР).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 13.0. Для оценки достоверности полученных результатов использовали критерий Манна–Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0.05$. Результаты экспериментов выражали как среднее арифметическое (M) ± стандартная ошибка среднего (SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было установлено, что соотношение ЗИ/ЗР у неадаптированных крыс, которым вводили гидроксипропил-β-циклодекстрин или физиологический раствор, составляет около 50%. Разницы по ЗИ/ЗР между этими группами животных не обнаружено. Коронарооккклюзия и реперфузия не оказывали достоверного эффекта на частоту сердечных сокращений и артериальное давление. Ни в данной серии эксперимента, ни в последующих сериях мы не наблюдали летальности при воздействии НГ или при выполнении коронарооккклюзии–реперфузии.

Было установлено, что НГ способствует уменьшению соотношения ЗИ/ЗР на 30% (рис. 1). Предварительное введение L-NAME за 15 мин до НГ полностью устраняло инфаркт-лимитирующий эффект НГ. Инъекция L-NAME за 10 мин до коронарооккклюзии не влияла на кардиопротекторный эффект НГ. Эти данные указывают на то, что NO является триггером, но не конечным эффектором НГ-индуцированной толерантности сердца к И/Р. Введение ингибитора iNOS S-метилтиомочевины за 15 мин до НГ нивелировало кардиопротекторный эффект адаптации к гипоксии. Ингибитор nNOS 7-нитроиндазол не влиял на инфаркт-лимитирующий эффект НГ. Следует отметить, что L-NAME, 7-нитроиндазол, S-метилтиомочевина не влияли на соотношение ЗИ/ЗР у неадаптированных крыс. L-NAME вызывал снижение частоты сердечных сокращений и увеличивал систолическое артериальное давление.

Эти данные указывают на то, что триггером НГ-индуцированной толерантности сердца к И/Р является NO, синтезируемый iNOS. Донор оксида азота DETA/NO также увеличивал устойчивость сердца к И/Р. DETA/NO не оказывал достоверного эффекта на частоту сердечных сокращений и артериальное давление.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мишенью для действия оксида азота на сердце являются кардиомиоциты и гладкомышечные клетки коронарных артерий [7–10]. Хорошо известно, что NO-синтаза принимает участие в повышении толерантности сердца к И/Р при ишемическом пре- и пост-кондиционировании [11, 12]. С учетом схожести эффектов пре-, постконди-

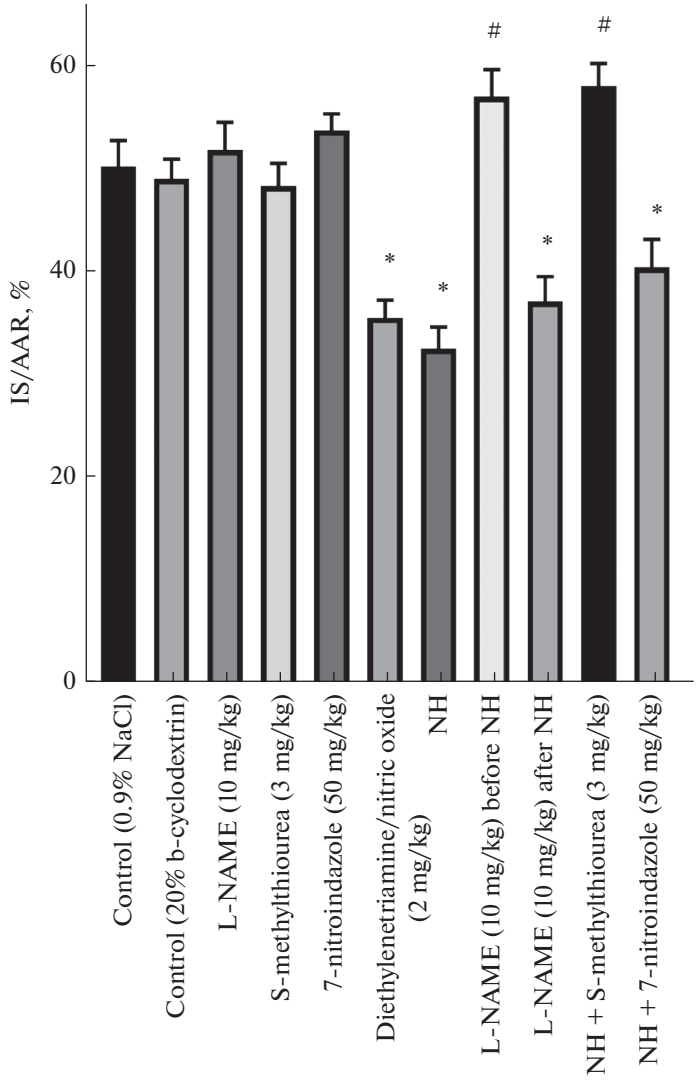


Рис. 1. Влияние ингибиторов NO-синтазы и донора NO диэтилентриамина на размер инфаркта у крыс после курса НГ. IS/AAR – отношение зоны некроза к зоне риска, NH – нормобарическая гипоксия (НГ); * – $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой (0.9%-ный раствор NaCl), # – $p < 0.05$ по сравнению с группой НГ, U-критерий Манна–Уитни.

ционирования и НГ, мы выдвинули предположение о важной роли NO-синтазы в механизме формирования кардиопротекторного эффекта НГ [13, 14]. Однако вопрос об участии отдельных изоформ NOS оставался открытым. Предполагалось, что медиаторами НГ являются iNOS [14] и эндотелиальная NO-синтаза [13]. Нами было подтверждено, что блокада iNOS нивелирует инфаркт-лимитирующий эффект НГ, в то время как nNOS не участвует в реализации данного кардиозащитного эффекта. Факт участия iNOS в повышении толерантности сердца к И/Р предоставил возможность имитировать инфаркт-лимитирующий эффект НГ. Предпола-

галось, что применение донора NO будет способствовать уменьшению размера инфаркта у интактных животных. Данная гипотеза была подтверждена, и нами было показано, что внутривенное введение DETA/NO за 1 ч до моделирования коронарооккклюзии–реперфузии оказывает кардиопротекторный эффект, который выражался в уменьшении размера инфаркта.

Известно, что многие опосредованные NO эффекты связаны с активацией оксидом азота растворимой гуанилилциклазы (рГЦ) и повышением уровня циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) [15–17]. Кроме того, оксид азота способен взаимодействовать с сульфгидрильными группами белков, что приводит к образованию S-нитрозотиола (SNO) и посттрансляционной модификации протеинов, известной как S-нитрозилирование белков [18, 19]. Считается, что оба пути важны для кардиопротекции. Активация рГЦ с последующим повышением уровня цГМФ приводит к активации протеинкиназы G, которая активирует митохондриальный $K_{АТФ}$-канал с последующим повышением стабильности митохондриальной поры переменной проницаемости (mPTP, mitochondrial permeability transition pore) [15]. Повышение стабильности mPTP приводит к тому, что митохондрии кардиомиоцитов не подвергаются кальциевой перегрузке, снижается продукция активных форм кислорода и вероятность развития окислительного стресса [21].

Нитрозилирование играет важную роль в реализации кардиопротекторного эффекта ишемического прекондиционирования [20, 22]. Известно, что NO приводит к активации PKCε, митохондриальных $K_{АТФ}$-каналов и ингибированию открытия mPTP [22]. Вероятно, эти же молекулярные механизмы задействованы при при воздействии кратковременной НГ.

Таким образом, возможные механизмы кардиопротекторного действия кратковременной нормобарической гипоксии и NO включают каскады внутриклеточных трансмиттеров с активацией митохондриальных $K_{АТФ}$-каналов и повышением устойчивости mPTP, которые, по всей видимости, являются конечными эффекторами. Полученные нами данные указывают на то, что оксид азота является триггером, но не конечным эффектором кардиопротекторного эффекта кратковременной нормобарической гипоксии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Статья подготовлена при поддержке гранта РФФИ № 21-515-53003. Раздел, посвященный L-NAME, оформлен в рамках гос. задания 122020300042-4. Авторы выражают признательность Н.А. Данильченко за техническую помощь. Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования “Медицинская геномика”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Л.Н.М. и Н.В.Н. предложили концепцию и план работы. А.С.С. выполнил экспериментальную часть работы, И.А.Д. оформил рукопись статьи. С.В.Г. и A.S. участвовали в подборе литературных источников к статье и принимали участие в обсуждении представленных в статье данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Baxter GF, Ferdinandy P* (2001) Delayed preconditioning of myocardium: current perspectives. Basic Res Cardiol 96: 329–344.
https://doi.org/10.1007/s003950170041
2. *Tsibulnikov SY, Maslov LN, Naryzhnaya NV, Ma H, Lishmanov YB, Oeltgen PR, Garlid K* (2018) Role of protein kinase C, PI3 kinase, tyrosine kinases, NO-synthase, K_{ATP} channels and MPT pore in the signaling pathway of the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia. Gen Physiol Biophys 37: 537–547.
https://doi.org/10.4149/gpb_2018013
3. *Guo Y, Stein AB, Wu WJ, Zhu X, Tan W, Li Q, Bolli R* (2005) Late preconditioning induced by NO donors, adenosine A_1 receptor agonists, and δ_1-opioid receptor agonists is mediated by iNOS. Am J Physiol Heart Circ Physiol 289: H22517.
https://doi.org/10.1152/ajpheart.00341.2005
4. *Maslov LN, Naryzhnaya NV, Tsibulnikov S Yu., Kolar F, Zhang Y, Wang H, Gusakova AM, Lishmanov YuB* (2013) Role of endogenous opioid peptides in the infarct size-limiting effect of adaptation to chronic continuous hypoxia. Life Sci 93: 373–379.
https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.07.018
5. *Chiari PC, Bienengraeber MW, Weihrauch D, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS* (2005) Role of endothelial nitric oxide synthase as a trigger and mediator of isoflurane-induced delayed preconditioning in rabbit myocardium. Anesthesiology 103: 74–83.
https://doi.org/10.1097/00000542-200507000-00014
6. *Jiang X, Shi E, Nakajima Y, Sato S* (2004) Inducible nitric oxide synthase mediates delayed cardioprotection induced by morphine in vivo: evidence from pharmacologic inhibition and gene-knockout mice. Anesthesiology 101: 82–88.
https://doi.org/10.1097/00000542-200407000-00014
7. *Kamkin AG, Kamkina OV, Shim AL, Bilichenko A, Mitrokhin VM, Kazansky VE, Filatova TS, Abramochkin DV, Mladenov MI* (2022) The role of activation of two different sGC binding sites by NO-dependent and NO-independent mechanisms in the regulation of SACs in rat ventricular cardiomyocytes. Physiol Rep 10: e15246.
https://doi.org/10.14814/phy2.15246
8. *Richards MA, Simon JN, Ma R, Loonat AA, Crabtree MJ, Paterson DJ, Fahlman RP, Casadei B, Fliegel L, Swietach P* (2020) Nitric oxide modulates cardiomyocyte pH control through a biphasic effect on sodium/hydrogen exchanger-1. Cardiovasc Res 116: 1958–1971.
https://doi.org/10.1093/cvr/cvz311
9. *Thengchaisri N, Hein TW, Ren Y, Kuo L* (2021) Activation of coronary arteriolar PKCβ2 impairs endothelial NO-mediated vasodilation: role of JNK/Rho kinase signaling and xanthine oxidase activation. Int J Mol Sci 22: 9763.
https://doi.org/10.3390/ijms22189763
10. *Tawa M, Nakano K, Yamashita Y, He Q, Masuoka T, Okamura T, Ishibashi T* (2021) Alteration of the soluble guanylate cyclase system in coronary arteries of high cholesterol diet-fed rabbits. Pharmacol Res Perspect 9:e00838.
https://doi.org/10.1002/prp2.838
11. *Li XD, Cheng YT, Yang YJ, Meng XM, Zhao JL, Zhang HT, Wu YJ, You SJ, Wu YL* (2012) PKA-mediated eNOS phosphorylation in the protection of ischemic preconditioning against no-reflow. Microvasc Res 84: 44–54.
https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.04.002
12. *Frankenreiter S, Groneberg D, Kuret A, Krieg T, Ruth P, Friebe A, Lukowski R* (2018) Cardioprotection by ischemic postconditioning and cyclic guanosine monophosphate-elevating agents involves cardiomyocyte nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. Cardiovasc Res 114: 822–829.
https://doi.org/10.1093/cvr/cvy039
13. *Hu L, Zhou L, Wu X, Liu C, Fan Y, Li Q* (2014) Hypoxic preconditioning protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury through AMPK/eNOS/PGC-1α signaling pathway. Int J Clin Exp Pathol 7: 7378–7388.
14. *Cuong DV, Kim N, Youm JB, Joo H, Warda M, Lee JW, Park WS, Kim T, Kang S, Kim H, Han J* (2006) Nitric oxide-cGMP-protein kinase G signaling pathway induces anoxic preconditioning through activation of ATP-sensitive K^+ channels in rat hearts. Am J Physiol Heart Circul Physiol 290: H1808–H1817.
https://doi.org/10.1152/ajpheart.00772.2005
15. *Costa AD, Pierre SV, Cohen MV, Downey JM, Garlid KD* (2008) cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. Cardiovasc Res 77: 344–352.
https://doi.org/10.1093/cvr/cvm050
16. *Yu X, Ge L, Niu L, Lian X, Ma H, Pang L* (2018) The Dual Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Friend or Foe? Oxid Med Cell Longev 2018: 8364848.
https://doi.org/10.1155/2018/8364848

17. *Kraehling JR, Sessa WC* (2017) Contemporary Approaches to Modulating the Nitric Oxide-cGMP Pathway in Cardiovascular Disease. Circ Res 120: 1174–1182. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.303776
18. *Sun J, Murphy E* (2010) Protein S-nitrosylation and cardioprotection. Circ Res 106: 285–296. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209452
19. *Sun J, Aponte AM, Kohr MJ, Tong G, Steenbergen C, Murphy E* (2013) Essential role of nitric oxide in acute ischemic preconditioning: S-nitros(yl)ation versus sGC/cGMP/PKG signaling? Free Radic Biol Med 54: 105–112. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.005
20. *Sun J, Kohr MJ, Nguyen T, Aponte AM, Connelly PS, Esfahani SG, Gucek M, Daniels MP, Steenbergen C, Murphy E* (2012) Disruption of caveolae blocks ischemic preconditioning-mediated S-nitrosylation of mitochondrial proteins. Antioxid Redox Signal 16: 45–56. https://doi.org/doi.org/10.1089/ars.2010.3844
21. *Morciano G, Bonora M, Campo G, Aquila G, Rizzo P, Giorgi C, Wieckowski MR, Pinton P* (2017) Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. Adv Exp Med Biol 982: 169–189. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_9
22. *Penna C, Angotti C, Pagliaro P* (2014) Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning. Exp Biol Med (Maywood) 239: 647–662. https://doi.org/10.1177/1535370214522935

The Role of NO-Synthase in the Infarct-Limiting Effect of Normobaric Hypoxia

L. N. Maslov[a], N. V. Naryzhnaya[a], A. S. Sementsov[a], I. A. Derkachev[a, *], S. V. Gusakova[a], and Akpay Sarybaev[b, c]

[a] *Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Tomsk, Russia*
[b] *Department of Mountain and Sleep Medicine and Pulmonary Hypertension, National Center of Cardiology and Internal Medicine, Bishkek, Kyrgyzstan*
[c] *Kyrgyz-Indian Mountain Biomedical Research Center, Bishkek, Kyrgyzstan*
**e-mail: vanya.derkachev@mail.ru*

The study was performed in male Wistar rats. Animals were randomly divided into normoxic control groups and groups subjected to normobaric hypoxia (NH). NH was modeled using 6 consecutive cycles of hypoxia-reoxygenation: normobaric hypoxia (10 min)/reoxygenation (10 min). All animals were subjected to coronary occlusion (45 min) by applying a ligature to the left coronary artery, and reperfusion (2 h) by removing the ligature. Before modeling coronary occlusion, the following compounds were administered to rats: the non-selective NO-synthase inhibitor L-NAME at a dose of 10 mg/kg intravenously 15 min before NH or 10 min before coronary occlusion; inducible NO-synthase inhibitor (iNOS) S-methylthiourea at a dose of 3 mg/kg intraperitoneally 10 min before coronary occlusion; neuronal NO synthase (nNOS) inhibitor 7-nitroindazole at a dose of 50 mg/kg intravenously 10 min before coronary artery occlusion; a NO donor diethylenetriamine intravenously at a dose of 2 mg/kg (infusion over 5 min) one hour before coronary artery occlusion. It was found that L-NAME and S-methylthiourea completely abolished the infarct-limiting effect of NH. Diethylenetriamine increased cardiac tolerance to ischemia/reperfusion in normoxic control rats. It has been established that iNOS plays an important role in the cardioprotective effect of NH.

Keywords: heart, ischemia, reperfusion, normobaric hypoxia, NO-synthase

EDN: DRWEUQ
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 8, с. 940–956

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОЦЕНКА ПАРАКРИННЫХ ЭФФЕКТОВ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДЫ В ХОДЕ ЕЕ ПЕРЕКРЕСТНОГО ДОБАВЛЕНИЯ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ “КОНДУИТ–АРТЕРИЯ”

© 2022 г.
А. В. Фролов[1], Д. К. Шишкова[1], В. Е. Маркова[1, *], М. Ю. Синицкий[1], А. В. Синицкая[1], А. О. Поддубняк[1], А. Ю. Канонькина[1], Н. И. Загородников[1], Е. В. Григорьев[1], А. Г. Кутихин[1]

[1]*Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия*
**E-mail: markve97@gmail.com*

Поступила в редакцию 19.05.2022 г.
После доработки 15.07.2022 г.
Принята к публикации 22.07.2022 г.

Дисфункция эндотелия является одним из ключевых триггеров для развития болезней системы кровообращения, в том числе способствуя развитию тромбоза, рестеноза и неоатеросклероза в системе “кондуит–артерия”, возникающей при соединении венозного или артериального кондуита с коронарной артерией при коронарном шунтировании. Цель исследования – провести *in vitro* моделирование взаимодействий артериальных и венозных эндотелиальных клеток системы “кондуит–артерия”. Кондиционированная в течение 24 ч бессывороточная культуральная среда от монослоя первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (HCAEC), первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека (HITAEC) и первичных эндотелиальных клеток большой подкожной вены человека (HSaVEC) была перекрестно добавлена к интактному монослою тех же линий клеток на 24 ч. Далее был проведен анализ генной и белковой экспрессии в культурах эндотелиальных клеток, а также анализ профиля секретируемых ими в культуральную среду цитокинов, про- и антиангиогенных факторов. Анализ генной экспрессии показал, что добавление культуральной среды от HITAEC снижало выраженность стимулирующего клеточную адгезию провоспалительного ответа в HCAEC, в то время как добавление культуральной среды от HSaVEC, напротив, активировало транскрипцию в HCAEC генов провоспалительных цитокинов. В свою очередь, добавление культуральной среды от HCAEC способствовало поддержанию эндотелиального фенотипа HITAEC. Кондиционированная среда от артериальных эндотелиальных клеток стимулировала выделение про-ангиогенных молекул при воздействии на HCAEC и HSaVEC, но не HITAEC. Добавление кондиционированной среды от HSaVEC приводило к значимому снижению концентрации провоспалительного цитокина интерлейкина-6 во всех трех сценариях. Взаимодействия артериальных эндотелиальных клеток в модели HITAEC–HCAEC препятствуют их провоспалительной активации и увеличивают ангиогенный потенциал HCAEC, что частично объясняет повышенную проходимость артериальных кондуитов и устойчивость связанной с ними коронарной артерии к тромбозу, рестенозу и неоатеросклерозу в отдаленном послеоперационном периоде после коронарного шунтирования.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, коронарное шунтирование, паракринные эффекты, кондиционированная среда, коронарная артерия, большая подкожная вена, внутренняя грудная артерия

DOI: 10.31857/S0869813922080039

Сосудистые эндотелиальные клетки образуют внутреннюю выстилку всех кровеносных сосудов, как крупных – вен и артерий, так и мелких – артериол, венул и капилляров. Поскольку сосуды артериального и венозного русла имеют совершенно различное функциональное значение, фенотип и физиологический профиль экспрессии их клеточных популяций, в том числе эндотелиальные клетки, также существенно отличается [1, 2]. Эндотелиальные клетки артериальных и венозных сосудов выделяют большое количество различных регуляторных молекул, позволяющих регулировать проницаемость эндотелиального монослоя, транспорт макромолекул (в том числе атерогенных липопротеинов) и гемостаз, а также участвующих в модулировании клеточной адгезии и в процессах воспаления [3]. Различие в разнообразии выделяемых в микроокружение и в системный кровоток биоактивных факторов наблюдается не только между венами и артериями, но и между разными гистологическими типами артерий и даже между разными сегментами одной и той же артерии в зависимости от их геометрии [2, 4].

На сегодняшний день лучшим кондуитом для коронарного шунтирования – хирургического вмешательства с целью создания обходного пути (шунта) для восстановления коронарного кровотока – считается внутренняя грудная артерия (ВГА), поскольку она относительно устойчива к развитию атеросклероза, что обеспечивает ее проходимость даже в отдаленном послеоперационном периоде [5, 6]. Вместе с тем, хотя артериальные кондуиты демонстрируют более высокие показатели проходимости, чем венозные (в частности большая подкожная вена, БПВ), именно последние используются наиболее часто, поскольку их легче извлекать и проводить с ними хирургические манипуляции, а их длина позволяет осуществлять анатомическое соединение с любой коронарной артерией и производить сегментирование на несколько графтов. Несмотря на совершенствование хирургической техники и последующего медикаментозного лечения, а также технологий реабилитации и преабилитации, долгосрочная эффективность шунтов из подкожных вен остается ограниченной вследствие полной или гемодинамически значимой окклюзии (рестеноза) кондуитов или продолжающегося прогрессирования атеросклероза коронарных артерий (КА) [7–9]. Таким образом, оптимальная стратегия реваскуляризации сердечной ткани при помощи коронарного шунтирования все еще остается предметом активных дискуссий кардиохирургов и физиологов.

Для оценки особенности взаимодействий между артериальными и венозными эндотелиальными клетками в формирующейся при коронарном шунтировании морфофункциональной системе “кондуит–артерия” ранее нами была осуществлена работа по сокультивированию трех клеточных линий – эндотелиальных клеток КА (в англоязычной терминологии – HCAEC, от human coronary artery endothelial cells), эндотелиальных клеток ВГА (в англоязычной терминологии – HITAEC, от human internal thoracic artery endothelial cells) и эндотелиальных клеток БПВ (в англоязычной терминологии – HSaVEC, от human saphenous vein endothelial cells). Сокультивирование HCAEC и HITAEC взаимно способствовало экспрессии эндотелиальной синтазы монооксида азота (eNOS) и поддержанию эндотелиального фенотипа, снижая экспрессию транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода и повышая экспрессию транскрипционных факторов артериальной дифференцировки. Сокультивирование HCAEC и HSaVEC также индуцировало артериальное репрограммирование HSaVEC. Кроме того, сокультивирование HCAEC и HITAEC приводило к повышенному выделению про-ангиогенных молекул в микроокружение, вероятно, способствуя сосудистой регенерации. На основании этих результатов было предположено, что паракринные взаимодействия HCAEC и эндотелиальных клеток кондуита (HITAEC или HSaVEC) могут влиять на сосудистый гомеостаз после коронарного шунтирования и, при их

благотворном влиянии, могут лежать в основе повышенной проходимости артериальных кондуитов в отдаленном периоде [10].

Несмотря на определенные преимущества модели сокультивирования артериальных и венозных эндотелиальных клеток (в частности прямое воздействие клеточных линий друг на друга), ее недостатком является отсутствие технической возможности отделить культуральную среду, кондиционированную конкретным типом эндотелиальных клеток (то есть среду, в которую выделяет внеклеточные везикулы и растворимые факторы только какой-либо определенный тип эндотелиальных клеток), поскольку в культуральной посуде с вставками для сокультивирования культуральная среда неизбежно перемешивается. Поэтому данную модель также было решено дополнить моделью перекрестного добавления кондиционированной среды с целью оценки изолированного влияния артериальных и венозных эндотелиальных клеток друг на друга. Впоследствии проводилось измерение уровня молекул, ответственных за эндотелиальный гомеостаз или обусловливающих развитие дисфункции эндотелия во всех указанных клеточных линиях – HCAEC, HITAEC и HSaVEC.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичные HCAEC (HCAEC, Cell Applications, каталожный номер 300K-05a), первичные HITAEC (HITAEC, Cell Applications, 308K-05a) и первичные HSaVEC (PromoCell, C-12231) были культивированы в среде MesoEndo Growth Medium (Cell Applications, 212-500) во флаконах T-150 (Techno Plastic Products, 90552) до формирования монослоя, после чего полная культуральная среда (Cell Applications, 212-500) для предотвращения контаминации внеклеточными везикулами из сыворотки после двукратной отмывки фосфатно-солевым буфером была заменена на бессывороточную среду с теми же факторами роста, что и в полной среде (Cell Applications, 212F-500). Через 24 ч (данный срок был обусловлен оптимальной продолжительностью сывороточной депривации, в течение которого монослой остается в неизменном виде без признаков патологического состояния клеток) указанная бессывороточная культуральная среда (кондиционированная среда, 30 мл от каждой клеточной линии) была забрана из данных флаконов и центрифугирована при 3000 *g* для очистки от крупного дебриса с последующим перекрестным добавлением во флаконы T-25 (Techno Plastic Products, 90026) с заранее культивированным в среде MesoEndo Growth Medium (Cell Applications, 212-500) монослоем от этих же доноров.

Таким образом, дизайн эксперимента предусматривал девять экспериментальных групп – HCAEC, к которым была добавлена кондиционированная среда от HCAEC (аутоконтроль), HITAEC и HSaVEC; HITAEC, к которым была добавлена кондиционированная среда от HCAEC, HITAEC (аутоконтроль) и HSaVEC; HSaVEC, к которым была добавлена кондиционированная среда от HCAEC, HITAEC и HSaVEC (аутоконтроль). Через 24 ч после перекрестного добавления HCAEC, HITAEC и HSaVEC во флаконах T-25 клетки были однократно отмыты в охлажденном (4°C) фосфатно-солевом буфере и далее лизированы в тризоле (15596018, Applied Biosystems) для выделения РНК или RIPA-буфере (Thermo Scientific, 89901) с коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз Halt (Thermo Scientific, 78444) для выделения белка согласно инструкциям производителей. Количественная оценка и контроль качества выделенных нуклеиновых кислот проводились при помощи спектрофотометрии на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), количественная оценка белка выполнялась с использованием набора BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23227) согласно инструкции производителя. Кондиционированная культуральная среда от этих клеток была забрана, центрифугирована при 12000 *g* для очистки от крупного дебриса и заморожена при –60°C для измерения уровня выделяемых

клетками молекул при помощи дот-блоттинга (скрининг) и иммуноферментного анализа (высокоточное определение).

Для измерения генной экспрессии вначале осуществлялась обратная транскрипция для синтеза кДНК (термоциклер Veriti, Applied Biosystems, набор High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 4368814, Applied Biosystems) согласно инструкции производителя. Далее проводилась собственно количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР) в соответствии с протоколом производителя мастер-микса (PowerUp SYBR Green Master Mix, A25777, Applied Biosystems) на приборе ViiA 7 (Applied Biosystems) в четырех повторах для каждого образца. Праймеры для кПЦР были разработаны в программе Primer-BLAST (National Institutes of Health) с использованием следующих параметров: длина ПЦР-продукта – от 70 до 150 пар оснований, температура плавления праймеров – от 59 до 65°C с различием между праймерами не более 3°C, включение интрона с длиной не менее 200 пар оснований – обязательно, длина праймера – от 18 до 22 нуклеотидов, содержание гуанина и цитозина в праймерах – от 40 до 60%, максимальная длина повтора одного и того же нуклеотида подряд – 4, максимальное содержание гуанина и цитозина на 3'-конце – не более 3 (60%), максимальная комплементарность праймеров – не более 5 условных единиц. Все остальные параметры программы соответствовали настройкам по умолчанию. Выбирались исключительно пары праймеров, специфичные к гену интереса. После разработки праймеров производился контроль их качества в программах PCR Primer Stats (Sequence Manipulation Suite, www.bioinformatics.org) и Multiple Primer Analyzer (Thermo Scientific Web Tools) на стандартных настройках. В случае обнаружения вероятных димеров разрабатывалась новая пара праймеров (до исключения всех возможных димеров). Синтез разработанных праймеров проводился в компании Евроген (Москва). В качестве референсного гена был выбран ген *PECAM1*, кодирующий обильно и стабильно экспрессируемый в ЭК рецептор CD31. Уровень экспрессии генов в артериальных и венозных эндотелиальных клетках рассчитывался при помощи $2^{-\Delta\Delta Ct}$-метода (поправка на экспрессию гена *PECAM1* в группе интереса и экспрессию гена интереса в референтной группе аутоконтроля – клеток, к которым была добавлена аутологичная кондиционированная среда). К примеру, в группе сравнений для HCAEC контролем были HCAEC, к которым была добавлена кондиционированная среда от HCAEC (аналогичная схема применялась для HITAEC и HSaVEC).

В качестве скрининговых генов были выбраны *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP* (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов), *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1* и *MIF* (основные эндотелиальные провоспалительные цитокины), *NOS3* (ген эндотелиальной NO-синтазы), *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*, *CDH5* и *CDH2* (транскрипционные факторы и маркеры эндотелиально-мезенхимального перехода), *HES1*, *HEY1*, *HEY2* и *NOTCH1* (транскрипционные факторы и рецептор артериальной эндотелиальной дифференцировки) и *NR2F2* (транскрипционный фактор венозной эндотелиальной дифференцировки). В таком экспериментальном дизайне повышенная экспрессия генов *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP* в сочетании с повышенной экспрессией генов *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1* и *MIF* свидетельствует о провоспалительной активации эндотелиальных клеток, сниженная экспрессия гена *NOS3* указывает на нарушенную способность эндотелиальных клеток выделять основной вазодилататор NO, а повышенная экспрессия генов *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* и *ZEB1* в сочетании со сниженной экспрессией гена сосудистого эндотелиального (VE) кадгерина *CDH5* и повышенной экспрессией гена мезенхимального кадгерина *CDH2* говорит об эндотелиально-мезенхимальном переходе. Сниженная экспрессия генов *HES1*, *HEY1*, *HEY2* и *NOTCH1* в сочетании с повышенной экспрессией гена *NR2F2* отражает сдвиг эндотелиальной дифференцировки от артериальной к венозной. Результаты измерения уровня генной экспрессии отображались в

виде тепловой карты (белый цвет обозначал отсутствие генной экспрессии, светло-зеленый цвет – кратность изменения (fold change) ≤0.5, светло-серый цвет – от 0.51 до 1.99, светло-фиолетовый цвет – ≥2).

Анализ уровня цитокинов и ангиогенных факторов в культуральной среде с восьми из девяти экспериментальных групп (всех, исключая HSaVEC после добавления кондиционированной среды от HITAEC в силу меньшей релевантности данной экспериментальной группы проверяемой гипотезе) был проведен с использованием соответствующих наборов для дот-блоттинга (ARY005B, R&D Systems; ab193655, Abcam) в соответствии с протоколами производителя. Хемилюминесцентная детекция проводилась посредством цифрового сканера блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences) в высокочувствительном режиме (12-минутное сканирование). С целью количественной верификации полуколичественных результатов дот-блоттинга в культуральной среде также была измерена концентрация интерлейкина-6 при помощи соответствующего набора для иммуноферментного анализа (430507, BioLegend) в соответствии с протоколом производителя. Колориметрическая детекция результата была проведена при помощи спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Scientific) при длине волны 450 нм.

Для проведения иммуноблоттинга одинаковые количества белка (15 мкг на образец) были смешаны с буфером на основе додецилсульфата лития NuPAGE (NP0007, Invitrogen) в соотношении 4 : 1 и восстановителем NuPAGE (NP0009, Invitrogen) в соотношении 10 : 1, денатурированы при 99°C в течение 5 мин и далее загружены на гель NuPAGE 4–12% Bis-Tris толщиной 1.5 мм (NP0335BOX, Invitrogen). В качестве маркера молекулярных масс использовалась смесь белковых стандартов Novex Sharp Pre-Stained (LC5800, Invitrogen) и MagicMark XP Western в соотношении 1 : 1 (LC5602, Invitrogen). Белки разделялись путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) при напряжении 150 В в течение 2 ч с использованием буфера для разделения белков NuPAGE MES SDS (NP0002, Invitrogen), антиоксиданта NuPAGE (NP0005, Invitrogen) и камеры для вертикального электрофореза XCell SureLock Mini-Cell (EI0001, Invitrogen). Перенос белка выполнялся с помощью мембран из поливинилидендифторида (IB24001, Invitrogen) и прибора для сухого переноса iBlot 2 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя в стандартном режиме для белков с молекулярной массой 30–150 кДа (P0 – 20 В в течение 1 мин, 23 В в течение 4 мин и 25 В в течение 2 мин). Мембраны далее инкубировались в растворе iBind Flex (SLF2020, Solution Kit Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) в течение 1 ч для предотвращения неспецифического связывания.

Для иммуноблоттинга использовались антитела кролика к провоспалительным молекулам клеточной адгезии VCAM1 (ab134047, 1 : 1000, Abcam) и ICAM1 (ab109361, 1 : 1000, Abcam), транскрипционному фактору эндотелиально-мезенхимального перехода ZEB1 (ab203829, 1 : 200, Abcam) и белку CD31 (контроль загрузки, ab9498, 1 : 1000, Abcam), антитела мыши к каспазе-3 (ab208161, 1 : 250, Abcam) и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназе (GAPDH, контроль загрузки, ab139416, 1 : 250, Abcam) и антитела козла к бета-тубулину (контроль загрузки, ab21057, 1 : 1000, Abcam). Конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела козла против кролика (7074, Cell Signaling Technology), козла против мыши (AP130P, Sigma-Aldrich) и осла против козла (ab205723, Abcam) были использованы в разведении 1 : 200, 1 : 1000 и 1 : 400 соответственно. Инкубирование с антителами выполнялось при помощи реагентов из набора iBind Flex (SLF2020, Invitrogen), карточек iBind Flex (SLF2010, Invitrogen) и прибора iBind Flex Western Device (SLF2000, Invitrogen) в течение 3 ч в соответствии с протоколами производителя. Хемилюминесцентная детекция проводилась с использованием субстрата SuperSignal West Pico PLUS

(34580, Thermo Scientific) и цифрового сканера блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences) в высокочувствительном режиме (12-минутное сканирование).

Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Данные были представлены в виде медианы, 25-го и 75-го процентилей и минимального и максимального значений. Анализ межгрупповых различий проводился с использованием критерия Краскела–Уоллиса с последующим попарным U-критерием Манна–Уитни, поправка на множественные сравнения выполнялась посредством применения средней доли ложных отклонений гипотез (false discovery rate, FDR по Беньямини, Кригеру и Йекутиели). Статистически значимой считалась вероятность отвергнуть верную нулевую гипотезу q (скорректированные с учетом FDR значения p) ≤ 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ генной экспрессии методом ОТ-кПЦР (рис. 1) продемонстрировал: 1) относительное снижение экспрессии генов провоспалительных молекул клеточной адгезии (VCAM1, ICAM1, SELE, SELP) в сочетании с признаками артериовенозной трансдифференцировки (снижение экспрессии генов артериальной дифференцировки HES1, HEY2 и NOTCH1 и повышение экспрессии гена венозной дифференцировки NR2F2) в HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HITAEC; 2) относительное повышение экспрессии практически всех генов провоспалительных молекул клеточной адгезии и цитокинов (VCAM1, ICAM1, SELE, SELP, CXCL8, CCL2, CXCL1, MIF), а также генов транскрипционных факторов и маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода (SNAI1, TWIST1, ZEB1, CDH2) в HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSaVEC; 3) относительное снижение экспрессии генов транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода (SNAI1, SNAI2, TWIST1) и артериальной дифференцировки (HES1, NOTCH1) в HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HCAEC; 4) относительное снижение экспрессии генов провоспалительных цитокинов (IL6, CXCL8, CCL2, CXCL1) и артериальной дифференцировки (HES1, NOTCH1) в HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSaVEC; 5) относительное повышение экспрессии генов провоспалительных молекул клеточной адгезии и цитокинов (VCAM1, ICAM1, SELP, IL6, CXCL8, CXCL1, MIF) и генов эндотелиально-мезенхимального перехода (SNAI1, TWIST1, ZEB1, CDH2) в HSaVEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HCAEC и особенно HITAEC. Таким образом, на уровне генной экспрессии, по аналогии с моделью сокультивирования клеточных линий, на модели перекрестного добавления кондиционированной среды: 1) культуральная среда от HITAEC в целом оказывала благотворное действие на HCAEC, снижая их потенциальную провоспалительную активность, в то время как культуральная среда от HSaVEC, напротив, провоцировала провоспалительную активацию и эндотелиально-мезенхимальный переход HCAEC; 2) культуральная среда от HCAEC способствовала поддержанию эндотелиального фенотипа HITAEC (при этом культуральная среда от HSaVEC снижала их провоспалительный потенциал): 3) в то же время культуральная среда от артериальных эндотелиальных клеточных линий (HCAEC и особенно HITAEC) индуцировала провоспалительную активацию и эндотелиально-мезенхимальный переход в HSaVEC.

При анализе профиля цитокинов, выделяемых различными артериальными и венозными эндотелиальными клетками после перекрестного добавления к ним кондиционированной культуральной среды (рис. 2) были выявлены: 1) уникальная экспрессия провоспалительного цитокина MCP-1/CCL2 в культуральной среде от HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HITAEC (в сравне-

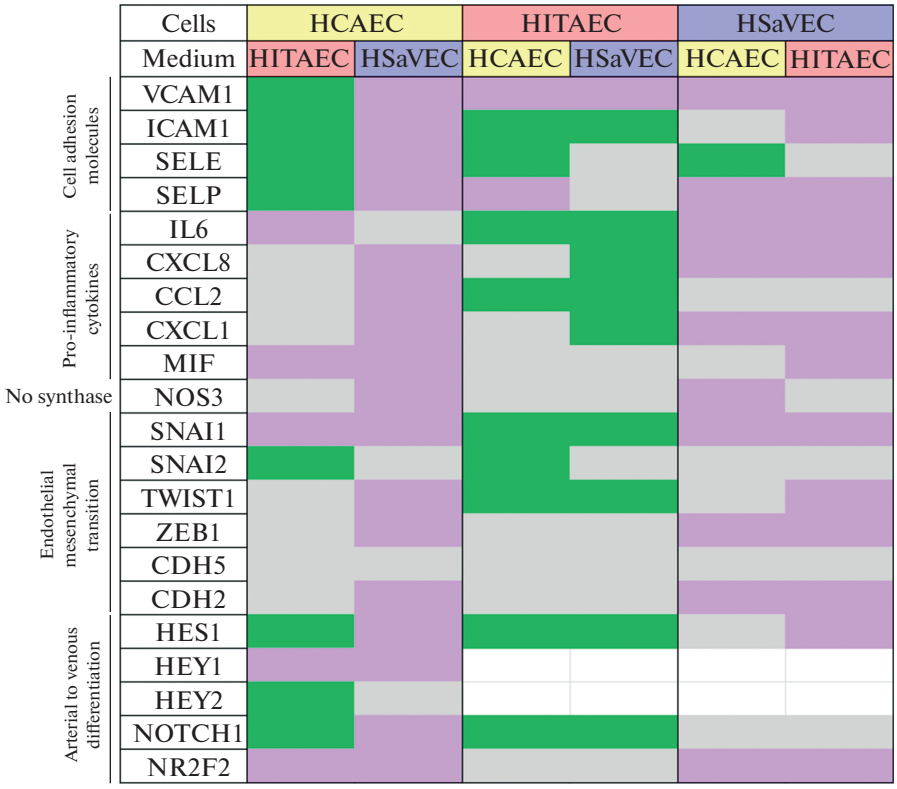


Рис. 1. Сравнительное измерение генной экспрессии (количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции) в культурах HCAEC (слева), HITAEC (в центре) и HSaVEC (справа), к монослою которых на 24 ч перекрестно добавили кондиционированную в течение 24 ч среду от монослоя клеток от тех же самых доноров (после центрифугирования при 3000 *g* для очистки от грубого клеточного дебриса) и далее выделили РНК (при помощи тризола) с последующей обратной транскрипцией до кДНК. Кондиционированная среда представляла собой культуральную среду, предварительно добавленную к монослою клеток тех же самых доноров (HCAEC, HITAEC и HSaVEC) на 24 ч. В качестве референсного гена был выбран *PECAM1* (кодирующий белок CD31), также проводилась нормализация генной экспрессии эндотелиальных клеток на величину экспрессии в аутоконтроле – клеточной линии, к которой была добавлена аутологичная кондиционированная среда ($^{2-\Delta\Delta Ct}$). VCAM1, ICAM1, SELE, SELP – молекулы клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов), повышенная экспрессия генов которых в сочетании с повышенной экспрессией генов основных эндотелиальных цитокинов (IL6, CXCL8, CCL2, CXCL1, MIF) свидетельствует о провоспалительной активации эндотелиальных клеток. NOS3 – эндотелиальная NO-синтаза, сниженная экспрессия гена которой может свидетельствовать о нарушенной способности эндотелиальных клеток выделять основную сосудорасширяющую молекулу (монооксид азота NO). SNAI1, SNAI2, TWIST1, ZEB1 – транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода, повышенная экспрессия генов которых в сочетании со сниженной экспрессией гена сосудистого эндотелиального (VE) кадгерина CDH5 и повышенной экспрессией гена мезенхимального кадгерина CDH2 указывает на эндотелиально-мезенхимальный переход. HES1, HEY1, HEY2 и NOTCH1 – транскрипционные факторы (HES1, HEY1, HEY2) и рецептор (NOTCH1) артериальной эндотелиальной дифференцировки, NR2F2 – транскрипционный фактор венозной эндотелиальной дифференцировки. Белый цвет обозначает отсутствие генной экспрессии, светло-зеленый цвет обозначает кратность изменения (fold change) ≤0.5, светло-серый цвет – от 0.51 до 1.99, светло-фиолетовый цвет – ≥2. Отсутствие экспрессии генов транскрипционных факторов артериальной эндотелиальной дифференцировки *HEY1* и *HEY2* в венозных эндотелиальных клетках (HSaVEC) указывает на техническую валидность проведенного анализа генной экспрессии (стоит отметить, что HITAEC также не экспрессируют эти гены в отличие от HCAEC).

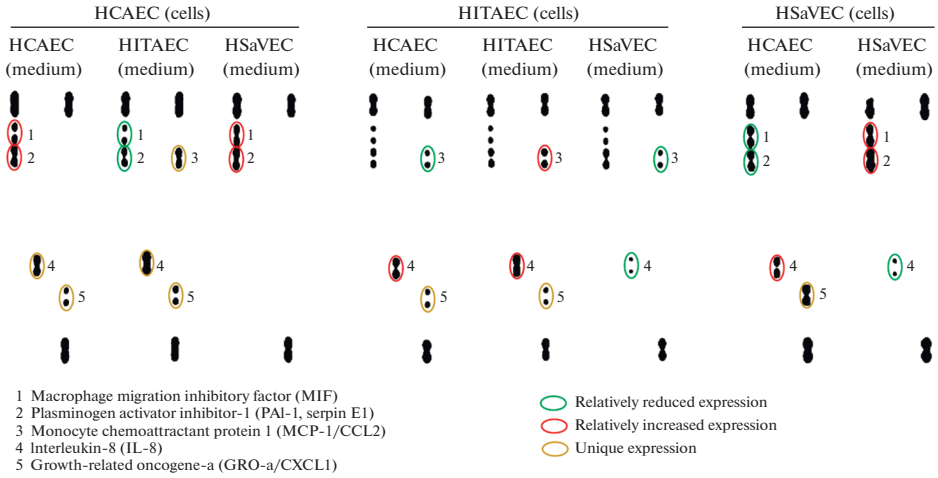


Рис. 2. Сравнительная оценка профиля цитокинов, выделяемых HCAEC (слева), HITAEC (в центре) и HSaVEC (справа), к монослою которых на 24 ч перекрестно добавляли кондиционированную в течение 24 ч среду от монослоя клеток от тех же самых доноров (после центрифугирования при 3000 *g* для очистки от грубого клеточного дебриса). Культуральная среда из эксперимента по оценке генной экспрессии. Дот-блоттинг (мембраны Proteome Profiler Human Cytokine Array, ARY005B, R&D Systems). Зеленым цветом выделены молекулы с относительно сниженной экспрессией, красным цветом – с относительно повышенной экспрессией, золотым цветом – с уникальной экспрессией.

нии с культуральной средой от HCAEC, к которым добавляли аутологичную кондиционированную среду); 2) отсутствие экспрессии провоспалительных цитокинов MCP1/CCL2, интерлейкина-8 и CXCL1 в культуральной среде от HCAEC, к которым добавляли аутологичную кондиционированную среду от HSaVEC; 3) относительное повышение уровня интерлейкина-8 и уникальную экспрессию CXCL1 в культуральной среде от HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от артериальных эндотелиальных клеток (в сравнении с культуральной средой от HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSaVEC); 4) относительное повышение уровня интерлейкина-8 и уникальная экспрессия CXCL1 в культуральной среде от HSaVEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HCAEC (в сравнении с культуральной средой от HSaVEC, к которым добавляли аутологичную кондиционированную среду). Таким образом, кондиционированная среда от артериальных эндотелиальных клеток стимулировала провоспалительный цитокиновый ответ (в частности активное выделение интерлейкина-8 и CXCL1) в сравнении с кондиционированной средой от венозных эндотелиальных клеток, при этом HITAEC также характеризовались повышенным выделением MCP-1/CCL2, а кондиционированная среда от них – способностью индуцировать выделение этого цитокина HCAEC.

Аналогичный анализ профиля про- и анти-ангиогенных молекул (рис. 3) показал: 1) относительное повышение уровня провоспалительного цитокина интерлейкина-6, про-ангиогенного плацентарного фактора роста (PlGF) и про-ангиогенной матрикс-ремоделирующей матриксной металлопротеиназы-1 (MMP-1) в культуральной среде от HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от артериальных эндотелиальных клеток (в сравнении с культуральной средой от HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSaVEC); 2) относительное повышение уровня про-ангиогенной молекулы ангиопоэтина-1 (ANGPT1)

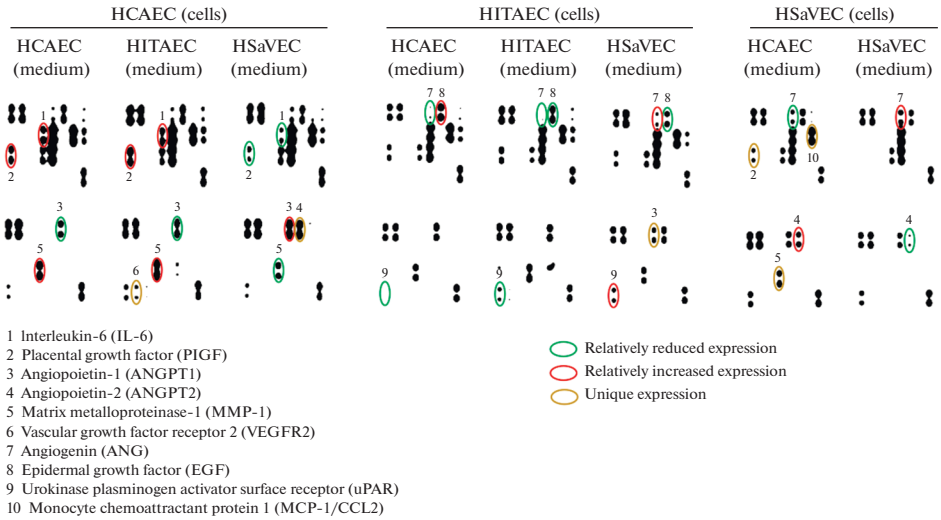


Рис. 3. Сравнительная оценка профиля про- и анти-ангиогенных молекул, выделяемых HCAEC (слева), HITAEC (в центре) и HSaVEC (справа), к монослою которых на 24 ч перекрестно добавляли кондиционированную в течение 24 ч среду от монослоя клеток от тех же самых доноров (после центрифугирования при 3000 *g* для очистки от грубого клеточного дебриса). Культуральная среда из эксперимента по оценке генной экспрессии. Дот-блоттинг (мембраны Human Angiogenesis Antibody Array – Membrane, ab193655, Abcam). Зеленым цветом выделены молекулы с относительно сниженной экспрессией, красным цветом – с относительно повышенной экспрессией, золотым цветом – с уникальной экспрессией.

в сочетании с уникальной экспрессией анти-ангиогенной молекулы ангиопоэтина-2 (ANGPT2) в культуральной среде от HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSaVEC (в сравнении с культуральной средой от HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от артериальных эндотелиальных клеток); 3) относительное повышение уровня про-ангиогенных молекул ангиогенина и рецептора к матрикс-ремоделирующей урокиназе (uPAR) в культуральной среде от HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSaVEC (в сравнении с культуральной средой от HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от артериальных эндотелиальных клеток); 4) относительное повышение уровня анти-ангиогенной молекулы ангиопоэтина-2 (ANGPT2) и уникальную экспрессию про-ангиогенного плацентарного фактора роста (PlGF), про-ангиогенной матрикс-ремоделирующей матриксной металлопротеиназы-1 (MMP-1) и провоспалительной молекулы MCP-1/CCL2 в HSaVEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HCAEC (в сравнении с HSaVEC, к которым добавляли аутологичную кондиционированную среду); 5) уникальную экспрессию провоспалительного цитокина интерлейкина-6 в культуральной среде от HCAEC, но не от HITAEC или HSaVEC. Таким образом, кондиционированная среда от артериальных эндотелиальных клеток обладала выраженным про-ангиогенным профилем при воздействии на HCAEC и HSaVEC, но не на HITAEC.

Дальнейший иммуноферментный анализ (рис. 4) обнаружил статистически значимое снижение концентрации провоспалительной молекулы интерлейкина-6 во всех случаях при добавлении кондиционированной среды от HSaVEC, а также в культурах HITAEC и HSaVEC при добавлении кондиционированной среды от HITAEC (однако при этом данная концентрация все равно была выше, чем при добавлении конди-

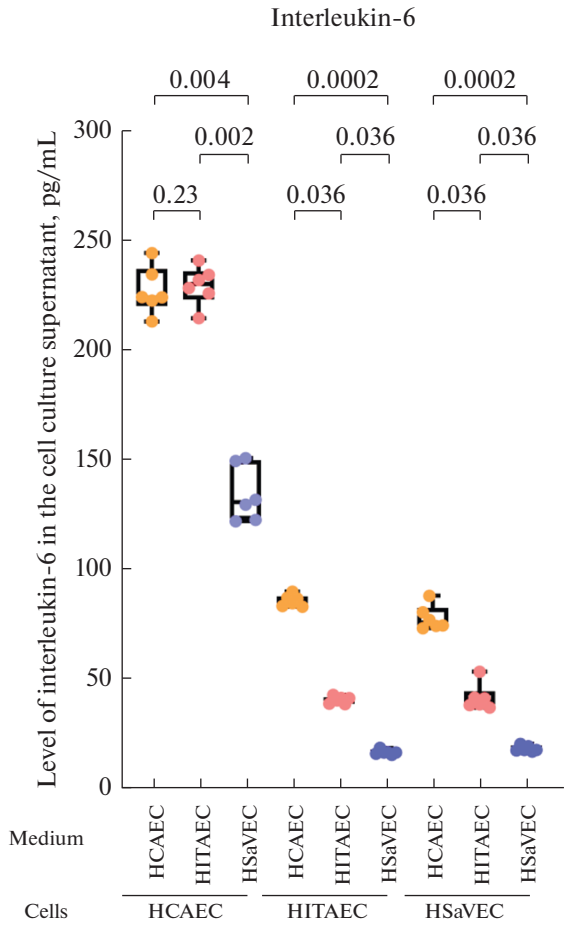


Рис. 4. Иммуноферментный анализ концентрации интерлейкина-6, выделяемого HCAEC (слева), HITAEC (в центре) и HSaVEC (справа), к монослою которых на 24 ч перекрестно добавляли кондиционированную в течение 24 ч среду от монослоя клеток от тех же самых доноров (после центрифугирования при 3000 *g* для очистки от грубого клеточного дебриса). Культуральная среда из эксперимента по оценке генной экспрессии. Иммуноферментный анализ (набор LEGEND MAX, 430507, BioLegend). $n = 6$ повторов на группу. Каждая точка на графиках отражает одно измерение. Оранжевый цвет отражает добавление кондиционированной культуральной среды от HCAEC, розовый – добавление кондиционированной культуральной среды от HITAEC, светло-фиолетовый – добавление кондиционированной культуральной среды от HSaVEC. Критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным U-критерием Манна–Уитни, поправка на множественные сравнения посредством применения средней доли ложных отклонений гипотез (false discovery rate, FDR по Беньямини, Кригеру и Йекутиели), значения q (скорректированные с учетом FDR значения P) приведены над графиками.

ционированной среды от HSaVEC). На основании полученных данных был сделан вывод о том, что HCAEC выделяют в микроокружение больше интерлейкина-6, чем HITAEC и HSaVEC, при этом их культивирование с кондиционированной средой от HSaVEC существенно снижает активность данного процесса.

Помимо анализа провоспалительного и ангиогенного секреторного профиля артериальных и венозных эндотелиальных клеток, также был проведен анализ экспрессии ими провоспалительных молекул клеточной адгезии (рецепторов эндоте-

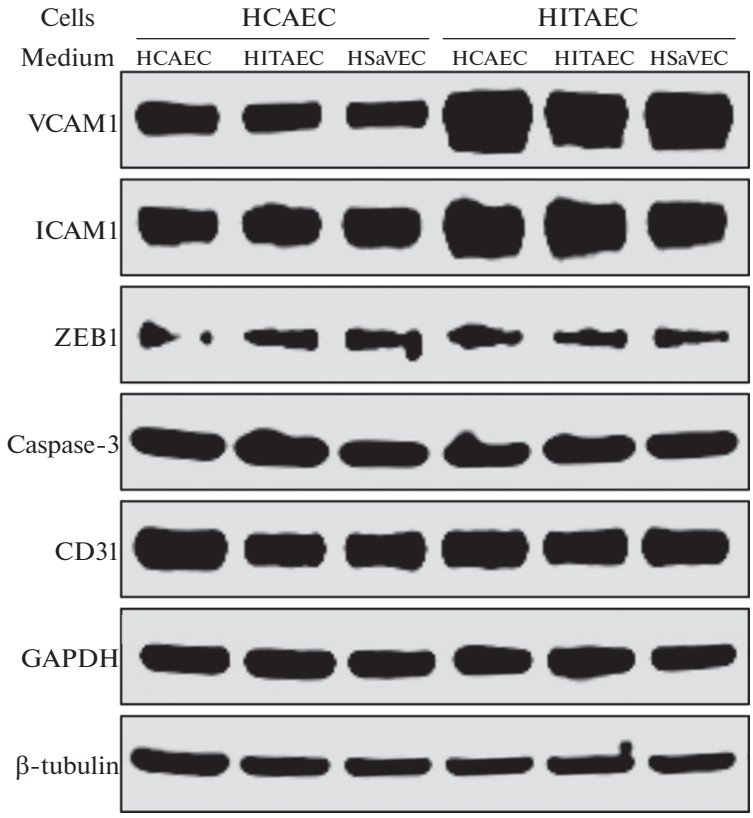


Рис. 5. Сравнительный анализ экспрессии провоспалительных молекул клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов VCAM1 и ICAM1), транскрипционного фактора эндотелиально-мезенхимального перехода (ZEB1), центрального апоптотического фермента (каспаза-3) и референсных белков (специфическая эндотелиальная молекула клеточной адгезии CD31, цитозольный фермент глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH) и белок цитоскелета бета-тубулин) в HCAEC (слева) и HITAEC (справа), к монослою которых на 24 ч перекрестно добавляли кондиционированную в течение 24 ч среду от монослоя клеток от тех же самых доноров (после центрифугирования при 3000 *g* для очистки от грубого клеточного дебриса). Иммуноблоттинг (антитела кролика к VCAM1 (ab134047, 1 : 1000, Abcam), ICAM1 (ab109361, 1 : 1000, Abcam), ZEB1 (ab203829, 1 : 200, Abcam), CD31 (ab9498, 1 : 1000, Abcam), антитела мыши к каспазе-3 (ab208161, 1 : 250, Abcam) и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназе (GAPDH, ab139416, 1 : 250, Abcam), антитела козла к бета-тубулину (ab21057, 1 : 1000, Abcam). Вторичные антитела козла против кролика (7074, Cell Signaling Technology, 1 : 200), козла против мыши (AP130P, Sigma-Aldrich, 1 : 1000) и осла против козла (ab205723, Abcam, 1 : 400), реагент для хемилюминесцентной детекции SuperSignal West Pico PLUS (34580, Thermo Scientific).

лиальных клеток для лейкоцитов VCAM1 и ICAM1), транскрипционного фактора эндотелиально-мезенхимального перехода ZEB1 (поскольку более значимые транскрипционные факторы этого процесса Snail и Slug по неясным причинам не были детектированы в лизате эндотелиальных клеток с данного эксперимента) и центрального апоптотического фермента – каспазы-3 (рис. 5):

Отсутствие видимых различий в экспрессии указанных белков между экспериментальными группами свидетельствовало о том, что кондиционированная среда от артериальных или венозных эндотелиальных клеток при добавлении к артери-

альным эндотелиальным клеткам не вызывает резких изменений уровня провоспалительных молекул клеточной адгезии или выраженной запрограммированной клеточной гибели.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В клинической практике выбор артериального или венозного кондуита для проведения коронарного шунтирования с учетом их структурных и функциональных особенностей играет определяющую роль для последующего клинического исхода (и качества жизни пациента после оперативного вмешательства) [11]. В сценарии гетеротопического функционирования, который сопровождается кардинальными изменениями гемодинамических условий, артериальные и венозные кондуиты могут оказывать совершенно различное влияние на шунтируемую КА [12] в рамках морфофункциональной системы “кондуит–артерия”. Концепция системы “кондуит–артерия” предлагает рассматривать хирургически соединенные коронарную артерию и артериальные/венозные кондуиты как единую и взаимно регулируемую систему, в основе которой лежат постоянные паракринные взаимодействия между кондуитом (как правило, БПВ или ВГА) и шунтируемой КА, физиологические или патологические эффекты которых определяют риск тромбоза и прогрессирование рестеноза или неоатеросклероза как в пораженной атеросклерозом КА, так и в изначально интактном кондуите [13]. В зависимости от выбора кондуитов формирование системы “кондуит–артерия” может происходить в виде создания артерио-артериального и венозно-артериального континуумов. По ранее полученным нашей группой данным, артерио-артериальный континуум является более благоприятным для поддержания коронарного гомеостаза в лучшей интеграции ВГА и КА на уровне эндотелиальных клеток за счет их взаимно благотворных паракринных взаимодействий, в то время как венозно-артериальный континуум между БПВ и КА может препятствовать развитию устойчивости соответствующих сосудов к атеросклерозу и рестенозу [10]. Концепция морфофункциональной системы “кондуит-артерия” позволяет рассматривать клинические проявления отдаленных послеоперационных осложнений в патофизиологической связи с природой кондуита, учитывая, что длительность его функционирования существенно различается в зависимости от его принадлежности к артериям или венам. Артериальные кондуиты в целом имеют более высокую долговременную проходимость: для ВГА она к 1-му году после коронарного шунтирования составляет 93–96%, через 5–7 лет – 88–98%, через ≥10 лет – 85–95%, для лучевой артерии – 89–92, 90–98, 89–91%, для правой желудочно-сальниковой артерии – 92–97, 80–90 и 62%, в то время как для БПВ – 81–98, 75–86 и 50–60% соответственно [14]. Причиной такого превосходства артерио-артериального континуума над венозно-артериальным может являться повышенное выделение ВГА атеропротективных молекул (NO и простациклина), препятствующих прогрессированию коронарного атеросклероза [15]. Сочетание благоприятных гистологических характеристик и атеропротективного физиологического профиля обеспечивает функциональную состоятельность артерио-артериального континуума даже в отдаленном периоде [13, 16], в то время как до 50% венозных кондуитов в рамках венозно-артериального континуума теряют свою проходимость в первые 5 лет [17]. Тем не менее, несмотря на общую устойчивость к липидной и воспалительной инфильтрации, у определенной доли пациентов артериальные кондуиты (в том числе ВГА) не справляются со своей задачей, вероятно, вследствие нарушенной регуляции функционирования сосудистых гладкомышечных клеток и их гиперпролиферации, возникающей вследствие их перехода с сократительного фенотипа на синтетический и являющейся субстратом для прогрессирования гипертрофии интимы [18]. Следует отметить, что различные патофизиологические сце-

нарии не всегда тождественны неблагоприятным клиническим исходам. К примеру, сохранение нативного кровоснабжения коронарной артерии часто приводит к нарушению функционирования шунта, не приводящему к развитию клинических симптомов, а окклюзия кондуита ассоциирована с нелетальными неблагоприятными исходами, в отличие от повторной окклюзии коронарной артерии, которая достаточно часто заканчивается смертью пациента [19].

Атерогенный и атеропротективный сценарии в морфофункциональной системе “кондуит–артерия” в значительной степени управляются ангиокринными свойствами эндотелиальных клеток коронарной артерии и кондуитов, которые секретируют огромное количество биоактивных факторов и показывают высокую степень гетерогенности как в зависимости от направления дифференцировки кровеносных сосудов (артерии или вены), так и от их локализации внутри артериального русла (к примеру, КА и ВГА) [20]. В частности, HITAEC (эндотелиальные клетки ВГА) характеризуются повышенной экспрессией эндотелиальной синтазы монооксида азота eNOS [21] и самого монооксида азота (NO), являющегося одним из ключевых вазодилататоров, в ответ на воздействие сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) [22]. Кроме этого, HITAEC также отличаются от HSaVEC (эндотелиальные клетки БПВ) повышенным уровнем циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), опосредующего вазодилатирующий эффект NO, простациклина (простагландина I2) и эндотелий-зависимого гиперполяризирующего фактора (EDHF) [23]. Такое многообразие вазоактивных факторов со стороны эндотелиальных клеток ВГА может приводить к различным паракринным эффектам, сопровождающимися гомеостатическими изменениями баланса про- и анти-ангиогенных молекул и про- и противовоспалительных цитокинов, в конечном счете способствуя физиологическому функционированию морфофункциональной системы “кондуит–артерия” в рамках артерио-артериального континуума. Одно из последних исследований показало, что в сравнении с БПВ, ВГА отличаются менее выраженным сократительным ответом на воздействие различных вазоконстрикторов (простагландинов E2 и F2α, фенилэфрина, лейкотриенов C4 и D, хлорида калия и арахидоновой кислоты), однако при этом характеризуются более выраженной ацетилхолин-индуцированной вазорелаксацией [24]. Следует отметить отсутствие ясного понимания того, какие именно цитокины или метаболиты могут способствовать развитию вышеупомянутых атерогенного и атеропротективного сценариев. Для ответа на этот вопрос следовало бы провести протеомное профилирование совокупности выделяемых эндотелиальных клеток в микроокружение молекул (секретома) при помощи жидкостной хроматографии, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией, однако данный подход является достаточно сложным и дорогим. С этой целью предпочтительным подходом для изначального анализа является скрининговое полуколичественное исследование при помощи дот-блоттинга (позволяющее определять содержание определенных функциональных классов молекул, к примеру, про- и противовоспалительных или про- и антиангиогенных) с последующей верификацией дифференциально экспрессированных молекул при помощи количественного иммуноферментного анализа.

В данном исследовании было проведено *in vitro* моделирование взаимодействий между эндотелиальными клетками кондуитов (HITAEC и HSaVEC) и эндотелиальными клетками КА (HCAEC) в контексте имитации артерио-артериального и венозно-артериального континуумов системы “кондуит–артерия”. Для этой цели было произведено перекрестное добавление кондиционированной среды к интактному монослою соответствующих эндотелиальных клеток с последующим измерением экспрессии ключевых эндотелиальных генов и белков, включая некоторые секретируемые ими факторы, с целью определения изолированного (в отличие от ранее примененной модели прямого сокультивирования [10]) влияния артери-

альных и венозных эндотелиальных клеток друг на друга. Результаты были проанализированы при помощи профилирования генной экспрессии (используя оригинальную панель генов для определения дисфункции эндотелия) методом ОТ-кПЦР, классического иммуноблоттинга, а также дот-блоттинга и иммуноферментного анализа секретируемых эндотелиальных клеток в микроокружение молекул в соответствии с указанным выше методологическим подходом.

Проведенные эксперименты позволили сделать следующие выводы:

Анализ генной экспрессии показал, что добавление культуральной среды от HITAEC снижало выраженность стимулирующего клеточную адгезию провоспалительного ответа в HCAEC, в то время как добавление культуральной среды от HSaVEC, напротив, активировало транскрипцию в HCAEC генов провоспалительных цитокинов. В свою очередь, добавление культуральной среды от HCAEC способствовало поддержанию эндотелиального фенотипа HITAEC. Кондиционированная среда от артериальных эндотелиальных клеток стимулировала выделение про-ангиогенных молекул при воздействии на HCAEC и HSaVEC, но не HITAEC. Добавление кондиционированной среды от HSaVEC приводило к статистически значимому снижению концентрации интерлейкина-6 во всех трех сценариях.

1. Взаимодействие артериальных эндотелиальных клеток в модели HITAEC (среда)–HCAEC (клетки) препятствует их провоспалительной активации на уровне транскрипции рецепторов эндотелиальных клеток к лейкоцитам (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*) и генов провоспалительных цитокинов (*CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*) и поддерживает эндотелиальный фенотип HITAEC, снижая транскрипцию генов транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*);

2. Артериальные эндотелиальные клетки обладают выраженной про-ангиогенной активностью в моделях HITAEC (среда)–HCAEC (клетки) и HCAEC (среда)–HSaVEC (клетки);

3. Венозные эндотелиальные клетки (HSaVEC) могут обладать противовоспалительным потенциалом в отношении подавления транскрипции гена *IL6* и снижения выделения кодируемого им провоспалительного цитокина интерлейкина-6 в микроокружение, что может иметь патофизиологическую значимость, учитывая повышенный базовый уровень выделения интерлейкина-6 HCAEC в сравнении с HITAEC и HSaVEC.

Таким образом, проведенные в данной работе эксперименты позволили предоставить патофизиологическое обоснование функциональных последствий взаимодействия эндотелиальных клеток КА (HCAEC), эндотелиальных клеток ВГА (HITAEC) и эндотелиальных клеток БПВ (HSaVEC) в рамках концепции морфофункциональной системы “кондуит–артерия”. Следует отметить, что полученные результаты частично проливают свет на паракринные эффекты эндотелиальных клеток в рамках как артерио-артериального, так и венозно-артериального континуума (в частности, подчеркивая вероятный противовоспалительный потенциал HSaVEC). Клиническая релевантность проведенного исследования заключается в наличии соответствующего хирургического сценария множественного коронарного шунтирования, при котором КА с окклюзионно-стенотическим поражением соединяется с кондуитом (шунтом), в качестве которого выступает ВГА или БПВ, получая таким образом кровь из артериального бассейна (аорта или подключичная артерия). В госпитальном периоде, как правило, венозные кондуиты по эффективности не уступают артериальным (поскольку их забор и манипуляции с ними при выполнении оперативного вмешательства существенно проще и сопряжены с меньшим риском развития инфекционных осложнений), однако в отдаленном периоде артериальное шунтирование имеет свои преимущества вследствие большей

устойчивости артериальных кондуитов к атеросклерозу, тромбозу и рестенозу в гетеротопической позиции.

Проведенные в ходе данного проекта патофизиологические изыскания не позволяют сделать однозначного вывода в пользу фундаментального обоснования выбора того или иного шунта, поскольку паракринные взаимодействия между артериальными эндотелиальными клетками более благотворны в отношении регенеративного ангиогенеза и поддержания артериального эндотелиального фенотипа, а венозные эндотелиальные клетки могут паракринно снижать провоспалительную активацию артериального эндотелия за счет меньшего выделения провоспалительных цитокинов. Вероятно, дальнейшая расшифровка патофизиологических сценариев, происходящих внутри артерио-артериального и венозно-артериального континуумов морфофункциональной системы “кондуит–артерия”, требует протеомного профилирования (в первую очередь секретома эндотелиальных клеток, то есть совокупности выделяемых ими в микроокружение молекул) при помощи масс-спектрометрических подходов с последующей верификацией дифференциально экспрессированных молекул посредством иммуноферментного анализа.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2021-001 “Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза и комплексных цифровых решений на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и определения риска летального исхода” при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта “Наука и университеты”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – А.В.Ф., А.Г.К., Е.В.Г., проведение экспериментов – Д.К.Ш., В.Е.М., М.Ю.С., А.В.С., А.О.П., А.Ю.К., обработка данных – А.Г.К., анализ литературных данных – А.Ю.К., В.Е.М., А.О.П., Н.И.З., написание статьи – А.В.Ф., В.Е.М., А.Ю.К., А.Г.К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *dela Paz NG, D’Amore PA* (2009) Arterial versus venous endothelial cells. Cell Tissue Res 335(1): 5–16.
https://doi.org/10.1007/s00441-008-0706-5
2. *Rafii S, Butler JM, Ding BS* (2016) Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. Nature 529(7586): 316–325.
https://doi.org/10.1038/nature17040
3. *Verrier ED, Boyle EM Jr* (1996) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. The Ann Thorac Surg 62(3): 915–922.
https://doi.org/10.1016/s0003-4975(96)00528-0
4. *Augustin HG, Koh GY* (2017) Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. Science (New York) 357(6353): eaal2379.
https://doi.org/10.1126/science.aal2379
5. *Zeff RH, Kongtahworn C, Iannone LA, Gordon DF, Brown TM, Phillips SJ, Skinner JR, Spector M* (1988) Internal mammary artery versus saphenous vein graft to the left anterior descending coronary artery: prospective randomized study with 10-year follow-up. Ann Thorac Surg 45(5): 533–536.
https://doi.org/10.1016/s0003-4975(10)64526-2

6. *Ray FR, Huang W, Slater M, Barden JA* (2002) Purinergic receptor distribution in endothelial cells in blood vessels: a basis for selection of coronary artery grafts. Atherosclerosis 162(1): 55–61. https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00681-5
7. *Wadey K, Lopes J, Bendeck M, George S* (2018) Role of smooth muscle cells in coronary artery bypass grafting failure. Cardiovasc Res 114(4): 601–610. https://doi.org/10.1093/cvr/cvy021
8. *Hadinata IE, Hayward PA, Hare DL, Matalanis GS, Seevanayagam S, Rosalion A, Buxton BF* (2009) Choice of conduit for the right coronary system: 8-year analysis of Radial Artery Patency and Clinical Outcomes trial. Ann Thorac Surg 88(5): 1404–1409. https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2009.06.010
9. *Lytle BW, Loop FD, Cosgrove DM, Ratliff NB, Easley K, Taylor PC* (1985) Long-term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. J Thorac Cardiovasc Surg 89(2): 248–258.
10. *Shishkova D, Markova V, Sinitsky M, Tsepokina A, Frolov A, Zagorodnikov N, Bogdanov L, Kutikhin A* (2020) Co-Culture of Primary Human Coronary Artery and Internal Thoracic Artery Endothelial Cells Results in Mutually Beneficial Paracrine Interactions. Int J Mol Sci 21(21): 8032. https://doi.org/10.3390/ijms21218032
11. *Dimeling G, Bakaeen L, Khatri J, Bakaeen FG* (2021) CABG: When, why, and how? Cleve Clin J Med 88(5): 295–303. https://doi.org/10.3949/ccjm.88a.20115
12. *Alizadehghobadi S, Biglari H, Niroomand-Oscuii H, Matin MH* (2021) Numerical study of hemodynamics in a complete coronary bypass with venous and arterial grafts and different degrees of stenosis. Comput Methods Biomech Biomed Engin 24(8): 883–896. https://doi.org/10.1080/10255842.2020.1857744
13. *Фролов АВ* (2019) Морфофункциональная система “кондуит-артерия”. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний 8(1): 112–122. [*Frolov AV* (2019) Morphological and functional system of graft-artery junctions. Complex Issues of Cardiovascular Diseases 8(1): 112–122. (In Russ)]. https://doi.org/10.17802/2306-1278-2019-8-1-112-122
14. *Gaudino M, Antoniades C, Benedetto U, Deb S, Di Franco A, Di Giammarco G, Fremes S, Glineur D, Grau J, He GW, Marinelli D, Ohmes LB, Patrono C, Puskas J, Tranbaugh R, Girardi LN, Taggart DP*, ATLANTIC (Arterial Grafting International Consortium) Alliance (2017) Mechanisms, Consequences, and Prevention of Coronary Graft Failure. Circulation 136(18): 1749–1764. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027597
15. *Kitamura S* (2011) Physiological and metabolic effects of grafts in coronary artery bypass surgery. Circ J 75(4): 766–772. https://doi.org/10.1253/circj.cj-10-1302
16. *Carrel T, Winkler B* (2017) Current trends in selection of conduits for coronary artery bypass grafting. Gen Thorac Cardiovasc Surg 65(10): 549–556. https://doi.org/10.1007/s11748-017-0807-8
17. *Калинин РЕ, Сучков ИА, Пшенников АС, Виноградов СА* (2019) Маркеры артериовенозной дифференцировки эндотелиальных клеток и их влияние на адаптацию аутовенозных кондуитов в реконструктивной хирургии магистральных артерий. Новости хирургии 27(1):91–100. [*Kalinin RE, Suchkov IA, Pshennikov AS, Vinogradov SA* (2019) Markers of arteriovenous differentiation of endothelial cells and their influence on adaptation of autovenous conduits in main arteries reconstructive surgery. Surgery News 27(1): 91–100. (In Russ)]. https://doi.org/10.18484/2305-0047.2019.1.91
18. *Malinska A, Podemska Z, Sujka-Kordowska P, Witkiewicz W, Nowicki M, Perek B, Witt M* (2017) Caveolin 2: a facultative marker of unfavourable prognosis in long-term patency rate of internal thoracic artery grafts used in coronary artery bypass grafting. Preliminary report. Interact Cardiovasc Thorac Surg 24(5): 714–720. https://doi.org/10.1093/icvts/ivw411
19. *Gaudino M, Di Franco A, Bhatt DL, Alexander JH, Abbate A, Azzalini L, Sandner S, Sharma G, Rao SV, Crea F, Fremes SE, Bangalore S* (2021) The association between coronary graft patency and clinical status in patients with coronary artery disease. Eur Heart J 42(14): 1433–1441. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab096
20. *Spadaccio C, Antoniades C, Nenna A, Chung C, Will R, Chello M, Gaudino M* (2020) Preventing treatment failures in coronary artery disease: what can we learn from the biology of in-stent restenosis, vein graft failure, and internal thoracic arteries? Cardiovasc Res 116(3): 505–519. https://doi.org/10.1093/cvr/cvz214
21. *Gaudino M, Toesca A, Maggiano N, Pragliola C, Possati G* (2003) Localization of nitric oxide synthase type III in the internal thoracic and radial arteries and the great saphenous vein: a comparative immunohistochemical study. J Thorac Cardiovasc Surg 125(6): 1510–1515. https://doi.org/10.1016/S0022-5223(03)00029-1

22. *Broeders MA, Doevendans PA, Maessen JG, van Gorsel E, Egbrink MG, Daemen MJ, Tangelder GJ, Reneman RS, van der Zee R* (2001) The human internal thoracic artery releases more nitric oxide in response to vascular endothelial growth factor than the human saphenous vein. J Thorac Cardiovasc Surg 122(2): 305–309.
https://doi.org/10.1067/mtc.2001.113602
23. *Tadjkarimi S, O'Neil GS, Luu TN, Allen SP, Schyns CJ, Chester AH, Yacoub MH* (1992) Comparison of cyclic GMP in human internal mammary artery and saphenous vein: implications for coronary artery bypass graft patency. Cardiovasc Res 26(3): 297–300.
24. *Ozen G, Aljesri K, Turkyilmaz G, Turkyilmaz S, Kavala AA, Topal G, Norel X* (2022) Comparative study of coronary artery bypass graft materials: reduced contraction and ADMA levels in internal mammary artery versus saphenous vein. J Cardiovasc Surg (Torino) 63(1): 69–77.
https://doi.org/10.23736/S0021-9509.21.11796-3

Paracrine Effects of Conditioned Medium during Its Cross-Addition to Arterial and Venous Endothelial Cells

A. V. Frolov[a], D. K. Shishkova[a], V. E. Markova[a, *], M. Yu. Sinitsky[a], A. V. Sinitskaya[a], A. O. Poddubnyak[a], A. Yu. Kanonykina[a], N. I. Zagorodnikov[a], E. V. Grigoriev[a], and A. G. Kutikhin[a]

[a] *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia*
**e-mail: markve97@gmail.com*

Endothelial dysfunction is among the major triggers of cardiovascular disease, also promoting thrombosis, restenosis, and neoatherosclerosis within the conduit and coronary artery upon the coronary artery bypass graft surgery. To recapitulate the paracrine interactions between arterial and venous endothelial cells (ECs) by cross-addition of the conditioned medium to the respective cell cultures. Conditioned (24 h) serum-free medium from confluent primary human coronary artery ECs (HCAEC), primary human internal thoracic artery ECs (HITAEC) and primary human saphenous vein ECs (HSaVEC) was added to a confluent monolayer of intact HCAEC, HITAEC, and HSaVEC for another 24 h. Cellular response has been assessed by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay. Gene expression analysis showed that HITAEC-conditioned medium ameliorated inflammatory response in HCAEC, in contrast to HSaVEC-conditioned medium. In turn, HCAEC-conditioned medium maintained the endothelial phenotype of HITAEC. Further, HCAEC- and HITAEC-conditioned medium stimulated release of pro-angiogenic molecules by intact HCAEC and HSaVEC cultures. HSaVEC-conditioned medium notably reduced the secretion of pro-inflammatory cytokine interleukin-6 in all cell cultures. Conclusions: Paracrine interactions between HITAEC and HCAEC govern their anti-inflammatory status and enhance HCAEC angiogenic potential, partially explaining the higher primary patency of arterial conduits and resistance of coronary artery to thrombosis, restenosis and neoatherosclerosis in the long-term period after total arterial revascularisation.

Keywords: endothelial cells, coronary artery bypass graft surgery, paracrine effects, conditioned medium, coronary artery, saphenous vein, internal thoracic artery

EDN: JFNNXZ
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 8, с. 957–969

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МОЗГ КАК АДАПТИВНЫЙ ФИЛЬТР: СТАЦИОНАРНЫЙ СЛУХОВОЙ ОТВЕТ НА АУДИОСТИМУЛЫ НА ОСНОВЕ БИНАУРАЛЬНЫХ БИЕНИЙ В ПРОЦЕССЕ ДНЕВНОГО СНА ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г.
Д. Е. Шумов[1, *], Д. С. Свешников[2], Е. Б. Якунина[2], З. В. Бакаева[2], О. В. Манкаева[2], В. Б. Дорохов[1]

[1]Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия
[2]Медицинский институт, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия
**E-mail: dmitry-shumov@yandex.ru*

Поступила в редакцию 15.06.2022 г.
После доработки 28.06.2022 г.
Принята к публикации 29.06.2022 г.

Одним из видов звуковых стимулов, исследуемых в качестве средств неинвазивного улучшения сна, являются т.н. “бинауральные биения” (ББ), ощущение, возникающее у слушателя в ответ на предъявление раздельно в правое и левое ухо двух монотонных, слегка отличающихся по высоте, звуков. Преимущество данного вида стимуляции заключается в том, что ББ ощутимы даже при очень малой громкости звука, по сути, граничащей с порогом слуха, т.е. такой стимул создает мало помех для сна. Однако исследовать закономерности его воздействия затруднительно ввиду слабости электрофизиологического отклика мозга. В данной работе поставлена цель проверить гипотезу резонанса (brainwave entrainment) в применении к аудиостимулам на основе ББ, предъявляемым в процессе кратковременного дневного сна человека. Полученные результаты демонстрируют не предусмотренную упомянутой гипотезой изменчивость стационарного слухового ответа (ССО) в зависимости от частоты ББ-стимула и стадии сна. Это необходимо учитывать при прогнозировании эффективности неинвазивных средств улучшения сна на основе эффекта ББ. Кроме того, анализ спектров ССО позволяет выдвинуть гипотезу, что засыпающий человеческий мозг проявляет себя по отношению к звуковым стимулам как саморегулирующая система, усиливающая те элементы слухового отклика на эти стимулы, которые способствуют углублению естественным образом наступающего сна.

Ключевые слова: бинауральные биения, слуховые вызванные потенциалы, стационарный слуховой ответ, дневной сон, инсомния

DOI: 10.31857/S0869813922080076

Актуальной темой прикладной сомнологии является поиск неинвазивных средств помощи при инсомнии. Одним из перспективных средств такого рода является акустическая (звуковая) стимуляция. В настоящее время акустическое воздействие для улучшения сна реализовано в коммерческих устройствах с обратной связью [1], в устройствах светозвуковой стимуляции (т.н. “майнд-машинах”, [2]), а также декларируется в аудиозаписях психотерапевтической направленности [3, 4] и некоторых онлайн-приложениях.

Что касается изучаемых типов звуковых стимулов для улучшения сна, то они варьируют от музыки, которая обладает сложной частотно-временной структурой, до

простых последовательностей щелчков или биений низкой частоты. В последнем случае объектом изучения являются как акустические, или “монауральные” биения, представляющие собой амплитудную модуляцию громкости звука, так и т.н. “бинауральные биения” (ББ) – психоакустическое явление, возникающее в ответ на предъявление раздельно в правое и левое ухо двух слегка отличающихся по высоте звуков [5]. Уникальность ББ по сравнению с другими звуковыми стимулами для улучшения сна заключается в том, что человек может ощутить их на очень малой громкости звука, по сути, граничащей с порогом слуха [5], т.е. такой стимул создает мало помех при засыпании. В области потребительской продукции в виде аудиозаписей и программных приложений тема ББ уже более 40 лет вызывает активный интерес, опирающийся на устные свидетельства об их эффективности, как правило, не подтвержденные научными данными.

Методы исследований влияния звуковых стимулов на ЭЭГ сна. Наиболее распространенным подходом к исследованию влияния звуковых стимулов на сон является анализ слуховых вызванных потенциалов (СВП). СВП, регистрируемые во сне, отличаются от таковых в бодрствующем состоянии, во всяком случае это относится к длиннолатентным СВП (ДСВП), в то время как ранние компоненты изменяются мало [6]. То есть латентность и амплитуда компонент ДСВП меняются как при переходе из бодрствования в сон, так и на отдельных стадиях сна [7–9]. Физиологические причины этих изменений изучены не до конца, а потому интерпретировать их следует с осторожностью.

Влияние стимулов на основе ББ тоже можно обнаружить путем наблюдения ДСВП. Но с помощью методов анализа латентности и амплитуды компонент ДСВП сделать это непросто ввиду крайне слабого влияния указанных стимулов на амплитуду ЭЭГ. Кроме того, трудности создает большая вариабельность параметров ДСВП, которая зависит как от фазы ЭЭГ-активности испытуемого в момент подачи стимула, так и от индивидуальной чувствительности к стимулу. Все это требует привлечения больших групп испытуемых, что не всегда доступно.

Альтернативным методом исследования является анализ стационарного слухового ответа ЭЭГ (ССО, англ. ASSR – “Auditory Steady State Response”). ССО представляет собой регистрируемый с помощью ЭЭГ ответ мозга на частотно-специфические звуковые стимулы, непрерывно звучащие в течение достаточно длительного промежутка времени, обычно не менее 1 с, для получения приемлемого разрешения по частоте. При этом составляющие частотные компоненты стимулов должны оставаться постоянными по амплитуде и фазе [10]. В случае сложного стимула, например, биений, ССО повторяет их огибающую и таким образом влияет на ЭЭГ-активность [11]. В отличие от ДСВП, для описания которых используют параметры амплитуды и латентности компонентов, в случае ССО принято использовать амплитудно-частотные и фазовые характеристики спектра. Чаще всего данная методика применяется в отоларингологии, поскольку позволяет объективно оценить слуховую чувствительность как у людей с нормальным слухом, так и с различными его нарушениями. Ее достоинствами являются устойчивость к точности представления исходных данных [12] и простота интерпретации полученных результатов [10].

Гипотеза резонанса. Основной рабочей гипотезой, объясняющей воздействие на сон ритмических звуковых (вообще говоря, – любых сенсорных) стимулов, является гипотеза резонанса (англ. “brainwave entrainment” [13]). Согласно этой гипотезе, ритмический стимул навязывает ритм ЭЭГ, и далее, по принципу обратной связи, этот навязанный ритм влияет на уровень бодрствования человека. Таким образом, стимулы с частотами, свойственными ЭЭГ сна, т.е. 1–7 Гц, должны углублять сон, а стимулы с частотами, свойственными ЭЭГ бодрствования, – препятствовать сну. Однако справедливость этого утверждения в процессе засыпания не очевидна. На-

пример, изменения в спектре ЭЭГ под воздействием ритмического аудиостимула могут быть *не только* на его основной частоте. Они могут иметь место также на других частотах спектра ЭЭГ, например, на частотах, являющихся гармониками и субгармониками основной частоты стимула. Т.е. звуковая стимуляция с частотой 16 Гц может вызывать ССО на частотах 8 и 4 Гц, а звуковая стимуляция с частотой 6 Гц – вызывать ССО на частоте 12 Гц. Соответственно характер влияния на уровень бодрствования таких стимулов может быть разным. Вероятно, он зависит от ряда сопутствующих факторов, которые предстоит исследовать. В работе [14] в качестве таких факторов указаны текущая потребность во сне и характер ЭЭГ-активности, определяемый, в первую очередь, уровнем бодрствования (стадией сна). Согласно результатам [14], предъявление изохронных акустических стимулов с частотой 40 Гц в фазе медленного сна приводит к достоверному увеличению плотности "сонных веретен" по сравнению с контролем, т.е. к углублению сна, хотя в спектре ЭЭГ эта частота находится далеко за пределами как диапазона 1–7 Гц, свойственного медленному сну, так и диапазона 11–16 Гц, свойственного "сонным веретенам". Такого рода факты требуют осторожности использования гипотезы резонанса при прогнозировании эффективности тех или иных ритмических звуковых стимулов для регулирования сна.

Наличие вышеупомянутых гармоник ССО в состоянии бодрствования показано для стимулов на основе акустических биений 40 и 80 Гц в работе [15]. В исследовании [16] аналогичный эффект был отмечен для акустических стимулов с частотами 4, 6, 8, 12, 20 и 40 Гц; кроме того, для частот 4 и 20 Гц он наблюдался также на 2-й (N2) и 3-й (N3) стадиях сна.

Что касается изменений ССО в зависимости от уровня бодрствования, то данный вопрос исследован в ряде работ, касающихся сна и применения общих анестетиков. Например, снижение мощности ССО во сне показано для акустических стимулов 40 Гц в работе [17], в которой, однако, не проводилось полноценное стадирование сна. В работе [18] показано последовательное снижение мощности 40 Гц ССО при переходе от бодрствования (W) к стадиям сна N1 (1-я стадия, дремота), N2 и N3. В обеих упомянутых работах частота акустической стимуляции была 40 Гц, поскольку целью работ было исследование не стимулов, способных повлиять на сон, а стимулов, дающих максимально амплитудный ССО. Тем не менее, в работе [16] диапазон частот исследованных во сне акустических стимулов был значительно расширен в сторону низких частот. Как было установлено, мощность ССО для всех этих частот (4, 6, 8, 12 и 20 Гц) также снижается на стадиях N2 и N3 медленного сна. При этом поведение ССО на стадии N1 осталось не исследованным. Результаты [16] относительно акустических стимулов могут служить ориентиром того, чего можно ожидать от ССО в случае стимулов на основе ББ, учитывая схожесть локализации и нейрофизиологических механизмов отклика мозга на акустические биения и ББ [11, 20]. Особенно интересны низкочастотные ББ-стимулы (<7 Гц), потенциально пригодные для воздействия на сон согласно гипотезе резонанса. Тем не менее, ССО во сне на стимулы на основе ББ, в отличие от стимулов на основе акустических биений, к настоящему времени мало изучен. Например, в работе [19] исследован ССО на музыку с эффектом ББ, предъявляемую в процессе дневного сна. Достоверных различий спектра ССО на частотах ББ с контрольными опытами (без стимула) в этой работе обнаружено не было, что можно объяснить сложностью частотно-временной структуры использованного стимула (музыки).

Таким образом, в данной работе была поставлена задача сравнить ССО для ББ 3-х разных частот – 4, 8 и 16 Гц – в процессе кратковременного дневного сна человека, с целью проверить применимость в данной ситуации сформулированной выше гипотезы резонанса.

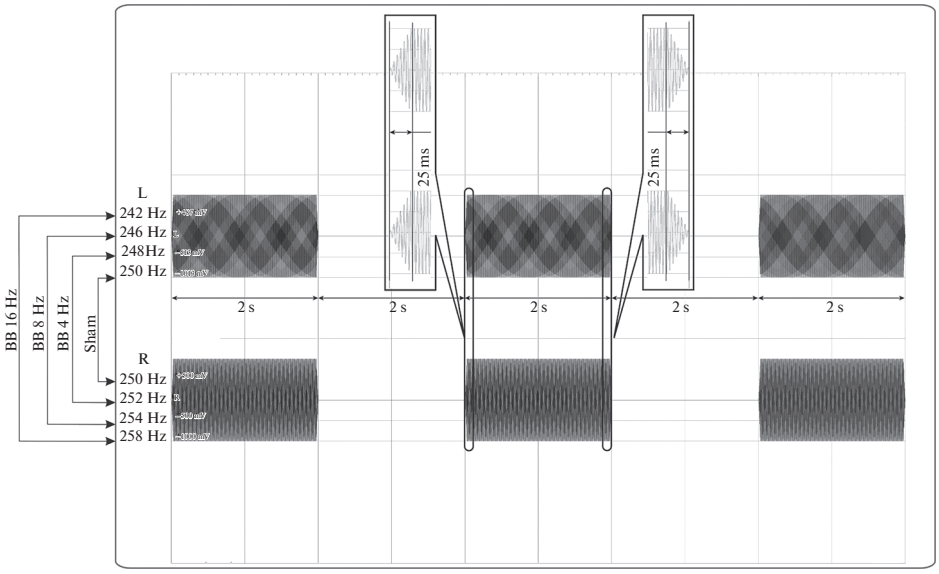


Рис. 1. 10-секундный фрагмент звукового стимула.
Стимул представлял собой чередующиеся 2-секундные промежутки тишины и 2-секундные периоды монотонного звука громкостью 61 дБ. Время нарастания и спада звука составляло 25 мс. Скобками слева связаны пары акустических частот, предъявленных в левое (L) и правое (R) ухо испытуемых, которые порождали эффект ББ 4, 8, 16 Гц, либо отсутствие биений (sham).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Стимулы

В данном исследовании были использованы стимулы, которые представляли собой участки монотонного звука длительностью 2 с, чередующиеся с 2-секундными паузами (рис 1). Громкость звука составляла 61 дБ уровня звукового давления (УЗД). Длительность нарастания и спада громкости – 25 мс. Эффект ББ, частота которых составляла либо 4, либо 8, либо 16 Гц, достигался за счет отличия высоты звука в правом и левом каналах. В контрольных опытах предъявляли звук без биений. Высота звука была следующей:

ББ 4 Гц: Левый канал – 248 Гц; Правый канал – 252 Гц.

ББ 8 Гц: Левый канал – 246 Гц; Правый канал – 254 Гц.

ББ 16 Гц: Левый канал – 242 Гц; Правый канал – 258 Гц.

Контроль: Левый канал – 250 Гц; Правый канал – 250 Гц.

Данные частоты ББ были выбраны потому, что, согласно гипотезе резонанса, они должны влиять на разные спектральные диапазоны ЭЭГ (дельта/тета, тета/альфа и бета соответственно). Выбор несущей частоты звука 250 Гц позволяет корректно сопоставить результаты данного эксперимента с результатами других исследований [11].

Испытуемые

Все процедуры, выполненные в данном исследовании, 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. Экспериментальная группа состояла из 27 студентов медицинского факультета Российского университета дружбы народов (16 мужчин и 11 женщин; от 18 до 31 года; средний возраст 20.7 ± 3.1 года). Со всеми участниками было подписано информированное согласие на участие в эксперименте. Все они декларировали отсутствие нарушений сна и назначенных препаратов, способных повлиять на уровень активности. Каждый испытуемый участвовал в четырех опытах (три – с предъявлением ББ и один – контроль). В первых 3 опытах предъявляли стимулы на основе ББ. Их предъявляли по контрбалансированной простой слепой схеме, т.е. испытуемый не знал, какая из 3 выбранных случайным образом частот ББ использована в конкретном опыте. Четвертый по счету опыт всегда был контрольным. Испытуемые должны были воздерживаться от курения и приема пищевых стимуляторов (кофе, чая и им подобных) в день эксперимента, а также от приема пищи за 2 ч до опыта. Перед каждым опытом участникам эксперимпента давали устную инструкцию не препятствовать естественному наступлению сна и, по возможности, прислушиваться к предъявляемым звуковым сигналам. Также фиксировали время дня, когда ставили опыт (с 12 до 18 ч) и пол испытуемых. Серия из 4 опытов с каждым испытуемым была выполнена в промежуток от 4 до 30 дней (среднее: 8.8 ± 7.3 дня).

Методика сбора данных

Полисомнограммы (ПСГ), в составе 19 каналов ЭЭГ, подключенных по монополярной схеме 10–20 с двумя референтными электродами на мастоидных костях, одного канала электроокулограммы, одного канала электрокардиограммы, регистрировали при помощи усилителя “Нейровизор БММ-36” (ООО “Медицинские компьютерные системы”, Москва), с электродным шлемом “MCScap Sleep” и программным обеспечением NeoRec 1.4. Частота дискретизации сигнала составляла 1000 Гц, были использованы высоко- и низкочастотный, а также режекторный, фильтры (0.5, 35 и 50 Гц соответственно). Одновременно с ПСГ, при помощи того же оборудования и с той же частотой дискретизации, записывали сигнал от двух звуковых каналов стимула.

В течение опыта испытуемый находился в звуко-, свето-защищенном помещении, при стабильной температуре 24°C. После наложения электродов (прессованный Ag/AgCl) испытуемый в стереонаушниках (Sennheiser HD-575, импеданс – 120 Ом, чувствительность – 97 дБ УЗД/мВт) располагался на кушетке. Ему давали устную инструкцию прислушиваться к биениям в звуке и, если получится, – уснуть, затем давали команду закрыть глаза, и 1 мин вели фоновую регистрацию ПСГ. Далее включали звуковой стимул, а по окончании стимуляции, длительность которой составляла 20 мин, испытуемого будили.

Методика обработки данных

Все ПСГ испытуемых были визуально стадированы согласно рекомендациям Американской академии медицины сна [21] с эпохой 30 с. Вычисления ССО проводили при помощи последовательности команд в среде Matlab согласно следующей процедуре (1):

1.1. Из каждой многоканальной ПСГ выделяли сигналы отведений C3 и C4, поскольку они являются стандартными в сомнологических исследованиях, позволяя оценивать активность как передних, так и задних областей головного мозга, и наименее подвержены влиянию артефактов. Также выделяли один звуковой канал (левый).

1.2. Для звукового сигнала строили огибающую, по которой ставили метки стимула. Таким образом, весь 20-минутный период записи делился на 300 интервалов по 4 с.

1.3. Визуально анализировали ЭЭГ-сигнал (при необходимости – всю ПСГ целиком), на предмет артефактов. Метки стимула, приходящиеся на интервалы с артефактами, удаляли.

1.4. Делали усреднение оставшихся 4-секундных интервалов для каждого испытуемого по отдельности.

1.5. При помощи дискретного преобразования Фурье, для каждого из полученных на этапе 1.4 индивидуальных ДСВП на временном участке от 1000 до 2000 мс (рис. 2), после линейного детрендинга, вычисляли амплитуды $A(f)$ спектра ЭЭГ в отведениях C3 и C4, для частот f в интервале от 2 до 20 Гц, с шагом 1 Гц.

1.6. Для каждого из 19 значений частоты f вычисляли относительную мощность $P_{\text{отн}}(f)$ как отношение квадрата соответствующего коэффициента Фурье $A^2(f)$ к средней мощности той же ДСВП, но на фоновом участке от 3000 до 4000 мс, где отсутствовал стимул (см. рис. 1):

$$P_{\text{отн}}(f) = A^2(f)\big/\langle P_{\text{фон}}\rangle,$$
$$\text{где} \quad \langle P_{\text{фон}}\rangle = \sum_{i=2}^{20}(A^2(i)_{\text{фон}})\big/N; \quad N = 19. \tag{1}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ временны́х параметров сна

На основе гипнограмм испытуемых в каждом из 81 опытов с предъявлением ББ были определены: общее время сна, латентность 1-й стадии, сна, латентность 2-й стадии сна, длительность 1-й стадии сна, суммарная длительность 2-й и 3-й стадий сна. Длительность 2-й и 3-й стадий подсчитывали совокупно, поскольку, в силу небольшой длительности опытов, 3-я стадия сна наблюдалась у испытуемых лишь эпизодически. В случае отсутствия у испытуемого признаков сна или 2-й его стадии соответствующую латентность 1-й или 2-й стадии приравнивали к 21 мин. Средние значения указанных величин приведены в табл. 1.

Дисперсионный анализ с повторными измерениями (3 × 2 rANOVA), учитывающий фактор пола испытуемых, показал достоверное влияние частоты стимула (фактора повторных измерений) на переменные “Латентность 2-й стадии сна”, “Суммарная длительность 2-й и 3-й стадий сна”, “Общее время сна”, а также значимое влияние смешанного фактора “пол × частота стимула” на переменные “Латентность 2-й стадии сна” и “Суммарная длительность 2-й и 3-й стадий сна” ($p < 0.05$). Изолированное влияние фактора пола ни на одну из переменных не было достоверным.

Рис. 2. На усредненных по отведениям C3 и C4 ДСВП испытуемых серыми полосами выделены интервалы 1000–2000 и 3000–4000 мс, использованные в процессе вычисления ССО (рис. 3). Усреднение выполнено по всему времени опыта (20 мин) и, помимо периодов сна, включает в себя периоды бодрствования (W), о чем свидетельствует выраженная компонента P300 [7]. По оси абсцисс отложено время усреднения в мс; по оси ординат – амплитуда ДСВП. Стимул предъявляли на интервале 0–2000 мс; (*a*) – стимул ББ 4 Гц; (*b*) – стимул ББ 8 Гц; (*c*) – стимул ББ 16 Гц. Серая кривая обозначает контроль (“sham”). Влияние частоты ББ на СВП лучше всего выражено на интервале примерно 750–2000 мс, во всяком случае, для частот 4 и 16 Гц. Для частоты 8 Гц это влияние заметно слабо.

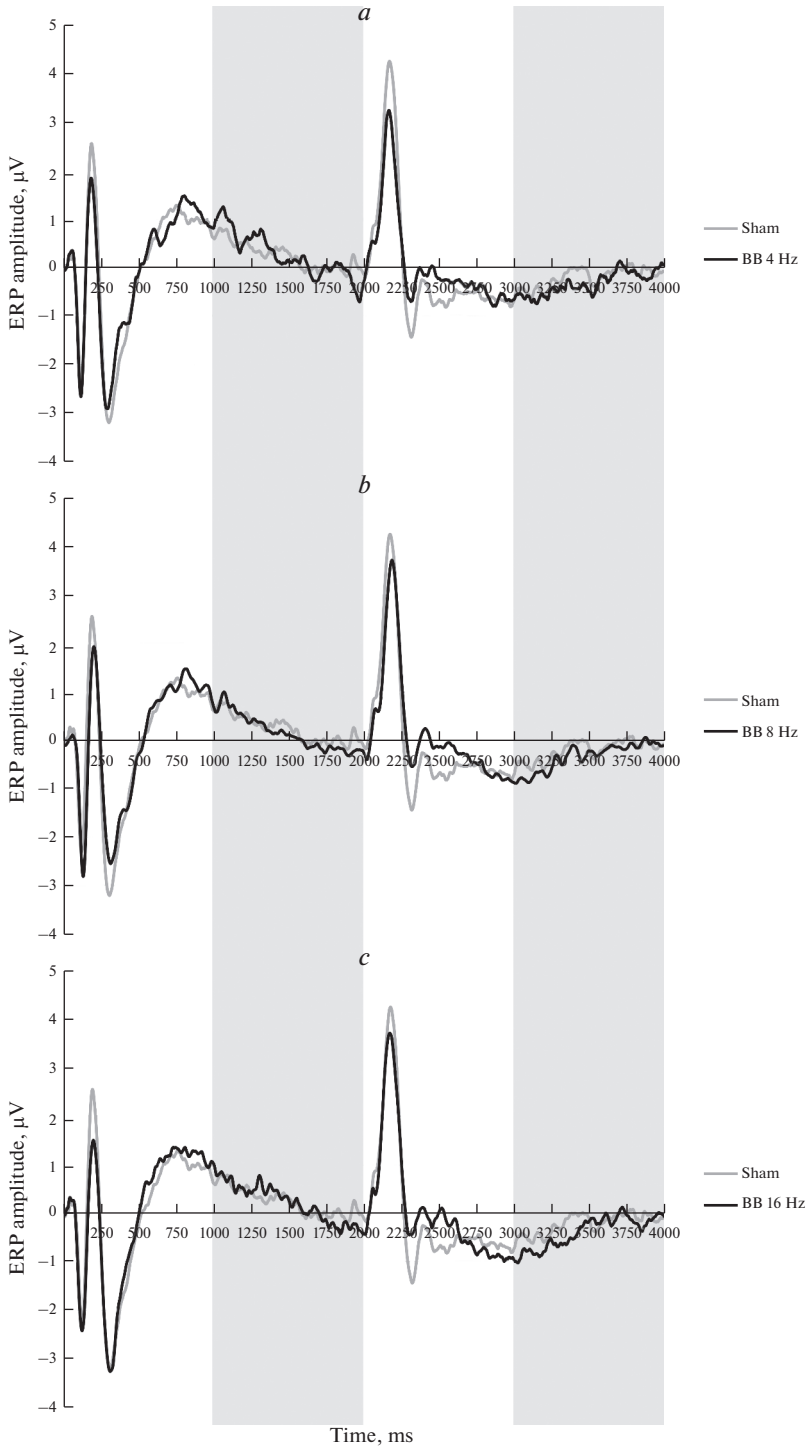

a
b
c
ERP amplitude, μV
Time, ms
Sham
BB 4 Hz
BB 8 Hz
BB 16 Hz

Таблица 1. Средние значения временны́х параметров сна испытуемых по итогам эксперимента. Скобкой отмечены статистически значимые различия на уровне $p < 0.05$, с учетом поправки Бонферрони на множественность сравнений

Параметр	Среднее значение ± стандартное отклонение, мин		
	ББ 4 Гц	ББ 8 Гц	ББ 16 Гц
Общее время сна	**13.1 ± 6.7**	**9.6 ± 7.0**	10.5 ± 7.3
Длительность 1-й стадии сна	7.8 ± 4.3	6.6 ± 4.8	7.0 ± 5.3
Суммарная длительность 2-й и 3-й стадий сна	**5.3 ± 5.0**	**3.0 ± 4.2**	3.5 ± 4.4
Латентность 1-й стадии сна	6.3 ± 6.3	9.1 ± 7.6	8.9 ± 7.7
Латентность 2-й стадии сна	**13.0 ± 6.1**	**16.1 ± 5.6**	15.0 ± 6.0

Анализ ССО

Первый этап анализа состоял в проверке предположения первой части гипотезы резонанса о наличии спектрального отклика ССО на частоте ББ стимула, т.е. что, например, стимул с частотой 4 Гц достоверно дает ССО на той же частоте. При этом амплитудное усреднение сигнала делали по всем безартефактным интервалам (1.4), безотносительно стадий сна.

В процессе статистической обработки для каждого из 3 значений частоты стимуляции f (4, 8, 16 Гц) была сформулирована отдельная нулевая гипотеза об отсутствии разницы средних значений $P_{\text{отн}}(f)$ в контрольных опытах и в опытах со стимуляцией. Гипотезы были проверены с помощью парного двустороннего t-критерия Стьюдента после логарифмического преобразования данных (для коррекции скошенности их распределения). Уровень достоверности для отклонения нулевых гипотез был принят $p < 0.05$. Итоги проверки гипотез (3 вида ББ против контроля) изображены на рис. 3.

Второй этап анализа имел целью исследовать спектр ССО раздельно для сна и бодрствования. Для решения поставленной задачи усреднение (п. 1.4 процедуры (1)) проводили раздельно для двух состояний испытуемых: бодрствования (W) и 1-й стадии сна (N1). Анализ для более глубоких стадий – 2-й и 3-й – не приведен ввиду слабой представленности этих стадий на гипнограммах испытуемых. Итоги изображены на рис. 4. Также для оценки достоверности различий был проведен дисперсионный анализ (2 × 2 ANOVA). Его необходимость продиктована возможной необъективностью прямого сравнения средних значений спектральной мощности отклика на стимул в состояниях W и N1, поскольку изменения могут быть вызваны естественными процессами засыпания, а не предъявлением стимула. Результаты анализа приведены в табл. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как видно из рис. 3, при усреднении по всему времени опыта, безотносительно сна или бодрствования, все три исследованных стимула (на основе ББ 4, 8 и 16 Гц) показали достоверный ССО на основной частоте ББ, что является подтверждением первой части гипотезы резонанса. Тем не менее, вторая ее часть, а именно прогнозирование эффективности навязывания сна на основе частоты ББ, присущей стимулу, остается спорной. Наилучшие временны́е показатели сна (общее время сна, длительность стадий N2 и N3, латентность N1 и N2) действительно наблюда-

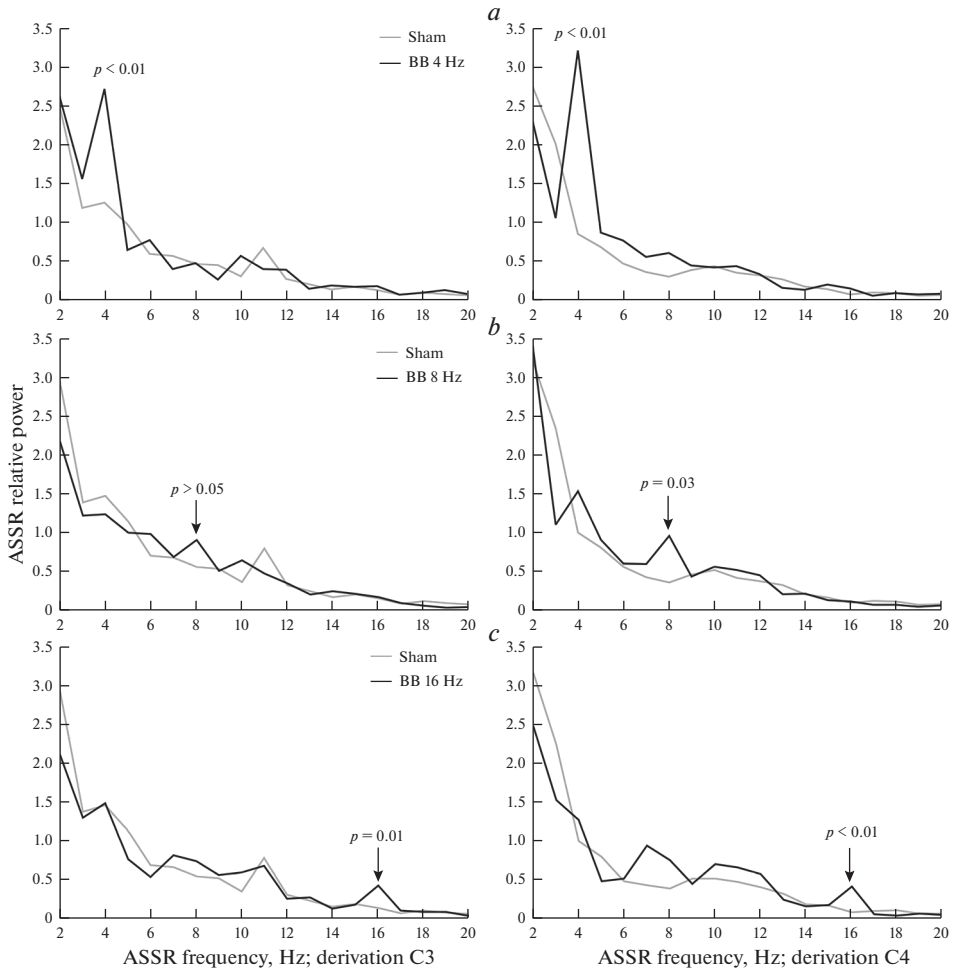


Рис. 3. Усредненные по всем испытуемым значения относительной мощности ССО в диапазоне от 2 до 20 Гц для отведений C3 и C4 по сравнению с контролем (“sham”). Индивидуальные усреднения произведены по всей длительности 20-минутной записи, включающей бодрствование и все стадии сна, наблюдавшиеся у испытуемого. По оси абсцисс отложена частота f спектра ССО в диапазоне от 2 до 20 Гц; по оси ординат – относительная мощность $P_{отн}$ спектра ССО (см. формулу (2)). Стрелками показаны различия отклика на основной частоте между стимулом и контролем. (*a*) – стимул 4 Гц; (*b*) – стимул 8 Гц; (*c*) – стимул 16 Гц.

ются при стимуляции с частотой 4 Гц (табл. 1). Однако между теми же показателями при частотах стимуляции 8 и 16 Гц значимых различий нет. Это можно объяснить кросс-частотным эффектом: аудиостимулы порождают отклик ЭЭГ не только на собственной частоте, но также на ее гармониках и субгармониках, которые в данном случае пересекаются: для стимула ББ 16 Гц 1-й и 2-й субгармониками будут 8 и 4 Гц, для стимула ББ 8 Гц частота 4 Гц будет 1-й субгармоникой, а 16 Гц – 1-й гармоникой; для стимула ББ 4 Гц частоты 8 и 16 Гц будут соответственно 1-й и 2-й гармониками (рис. 4). Причем, кросс-частотный эффект по-разному проявляется на стадиях W и N1. Например, стимул 16 Гц на стадии N1 достоверно порождает ССО на

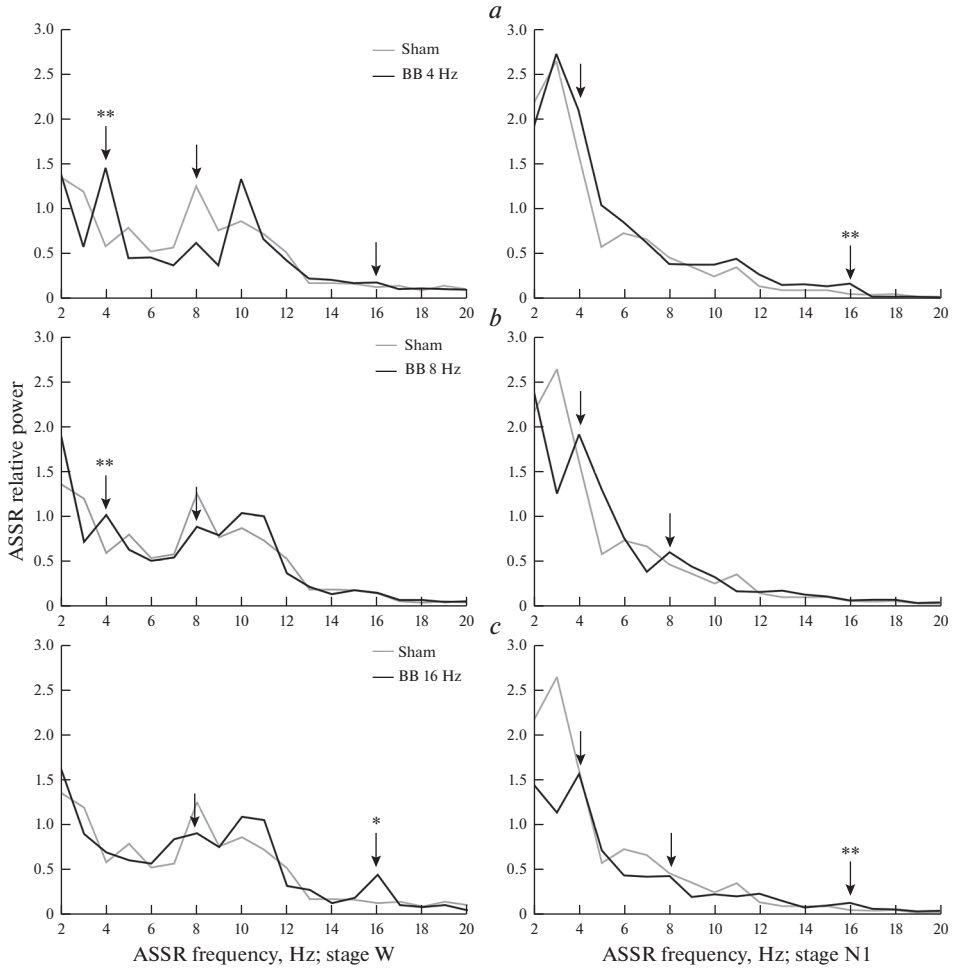


Рис. 4. Усредненный спектр ССО испытуемых на разных стадиях сна.
1-й столбец – бодрствование (W); 2-й столбец – 1-я стадия сна (N1). По оси ординат отложены средние по группе и по отведениям C3 и C4 значения относительной мощности ССО – $P_{отн}$ (см. формулу (1)). По оси абсцисс отложена частота ССО в диапазоне от 2 до 20 Гц. Вертикальными стрелками показан отклик на частоте стимула, а также его видимых гармониках и субгармониках. Звездочками помечены значимые различия с контролем, по результатам дисперсионного анализа (2 × 2 ANOVA): * – $p < 0.05$; **– $p < 0.01$. См. также табл. 2.

2-й субгармонике 4 Гц (фактор “стадия” в табл. 2), что закономерно приводит к более быстрому, чем ожидалось в соответствии с гипотезой резонанса, засыпанию. Та же самая субгармоника 4 Гц наблюдается и для ББ-стимула 8 Гц. Этим фактом можно объяснить слабые отличия длительности 1-й стадии сна для всех трех видов ББ (табл. 1). Таким образом, полученные результаты демонстрируют не предусмотренную гипотезой резонанса изменчивость ССО в зависимости от частоты ББ-стимула и стадии сна. Эту изменчивость необходимо учитывать при прогнозировании эффекта неинвазивных средств помощи при инсомнии на основе ББ.

Данные выводы интересно сравнить с выводами работы [16], где похожее исследование проведено для стимулов на основе обычных акустических (монауральных)

Таблица 2. Статистический анализ (2 × 2 ANOVA) факторов, влияющих на мощность отдельных гармоник ССО (строка “гармоники ССО”) для каждого из 3-х исследованных стимулов на основе ББ: 4, 8, 16 Гц (столбец “Стимул”), в отведениях C3 и C4

Стимул	ССО гармоники		4 Гц		8 Гц		16 Гц	
	отведение		C3	C4	C3	C4	C3	C4
ББ 4 Гц	Фактор	Стадия	н/д	<0.01	н/д	н/д	н/д	<0.01
		Стимул	н/д	<0.01	н/д	н/д	<0.001	0.01
		Стадия × стимул	н/д	0.03	н/д	н/д	н/д	н/д
ББ 8 Гц	Фактор	Стадия	<0.01	<0.01	0.03	<0.01	н/д	н/д
		Стимул	н/д	0.03	н/д	н/д	н/д	н/д
		Стадия × стимул	н/д	0.02	0.02	н/д	н/д	н/д
ББ 16 Гц	Фактор	Стадия	<0.01	< 0.01	н/д	н/д	<0.001	<0.001
		Стимул	н/д	н/д	н/д	н/д	<0.001	<0.001
		Стадия × стимул	н/д	0.05	н/д	н/д	н/д	н/д

Исследовано влияние 2-х факторов: “стадия” – W или N1 – и “стимул” – ББ или контроль. В таблице приведены p – уровни для 2 указанных факторов, а также их взаимодействия. Всего клеток 54: (3 гармоники) × (2 отведения ЭЭГ) × (2 фактора + 1 взаимодействие) × (3 частоты стимула). “Н/д” означает, что нулевую гипотезу нельзя отвергнуть ($p > 0.05$). Смысл этих цифр разъяснен ниже.

биений. К сожалению, в [16] не проанализировано влияние частоты стимуляции на характеристики сна, например, на длительность стадий N2 и N3. Тем не менее, согласно выводам этой работы, мощность ССО на основной частоте стимула достоверно снижается на стадиях сна N2–N3 по сравнению с W для акустических стимулов с частотой 4 и 8 Гц. В данном исследовании для частоты ББ 8 Гц изменения ССО при переходе от W к N1 аналогичны (отклик падает), в то время как для частоты ББ 4 Гц тот же переход приводит, наоборот, к усилению ССО на основной частоте. Расхождение можно объяснить тем, что мощность ССО на низких частотах (<8 Гц) растет при переходе от стадии W к N1, после чего резко снижается при переходе к N2 и N3. Но для обоснованных заключений необходимы дополнительные исследования с достаточно большим временем сна, чтобы достоверно оценить ССО на стадиях N2–N3.

Интересным является также факт, что мощность ССО на частоте 4 Гц растет на стадии N1 для всех 3 частот ББ – 4, 8 и 16 Гц (рис. 4, табл. 2). И если для стимула 4 Гц это основная его частота, то для 8 и 16 Гц это субгармоника, которая естественным образом усиливается при переходе от W к N1, способствуя тем самым погружению в сон. То есть, засыпающий человеческий мозг на стадии N1 проявляет себя по отношению к звуковым стимулам на основе ББ как саморегулирующая система, усиливающая те элементы слухового отклика на эти стимулы, которые способствуют углублению естественным образом наступающего сна. Если проводить аналогию с теорией обработки сигналов, то наиболее близким определением будет, наверное, “адаптивный фильтр”.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-28-01769).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Д.С.С., Д.Е.Ш.; сбор данных – Е.Б.Я., З.В.Б., О.В.М.; обработка данных – Д.Е.Ш.; написание и редактирование манускрипта – Д.Е.Ш., В.Б.Д.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Пучкова АН, Ткаченко ОН, Трапезников ИП, Пилецкая ИА, Тиунова ЕВ, Сазонова ММ, Таранов АО, Груздева СС, Дорохов ВБ* (2019). Оценка потенциальных возможностей амбулаторного устройства Dreem, предназначенного для ЭЭГ-синхронизированной акустической стимуляции во время сна. Соц-экол технол 1: 96–112. [*Puchkova AN, Tkachenko ON, Trapeznikov IP, Piletskaya IA, Tiunova EV, Sazonova MM, Taranov AO, Gruzdeva SS, Dorokhov VB* (2019) Assessment of Potential Capabilities of "Dreem": An Ambulatory Device for EEG Phase-Locked Acoustic Stimulation During Sleep. Soc-Ecol Technol 9(1): 96–112. (In Russ)].
https://doi.org/10.31862/2500-2961-2019-9-1-96-112
2. *Tang HYJ, Vitiello MV, Perlis M, Riegel B* (2015) Open-loop neurofeedback audiovisual stimulation: A pilot study of its potential for sleep induction in older adults. Appl Psychophys Biof 40(3):183–188.
https://doi.org/10.1007/s10484-015-9285-x
3. *Alexandru BV, Róbert B, Viorel L, Vasile B* (2009) Treating primary insomnia: A comparative study of self-help methods and progressive muscle relaxation. J Evid-Based Psychot 9(1): 67.
4. *Picard LM, Bartel LR, Gordon AS, Cepo D, Wu Q, Pink LR* (2014) Music as a sleep aid in fibromyalgia. Pain Res Manag 19(2): 97–101.
https://doi.org/10.1155/2014/272108
5. *Oster G* (1973) Auditory beats in the brain. Sci Am 229(4): 94–103.
https://doi.org/10.1038/scientificamerican1073-94
6. *Atienza M, Cantero JL, Escera C* (2001) Auditory information processing during human sleep as revealed by event-related brain potentials. Clin Neurophysiol 112(11): 2031–2045.
https://doi.org/10.1016/S1388-2457(01)00650-2
7. *Дорохов ВБ, Вербицкая ЮС* (2005) Изменения компонентов слуховых длиннолатентных вызванных потенциалов на разных стадиях медленноволнового сна. Журн высш нерв деятельн им ИП Павлова 55(1): 21–30. [*Dorokhov VB, Verbitskaia IuS* (2005) Changes in components of the auditory long-latency evoked potentials at different stages of the slow-wave sleep. Zh Vyssh Nerv Deyat 55(1): 21–30. (In Russ)].
8. *Colrain IM, Campbell KB* (2007) The use of evoked potentials in sleep research. Sleep Med Rev 11(4): 277–293.
https://doi.org/10.1016/j.smrv.2007.05.001
9. *Ibáñez AM, Martín RS, Hurtado E, López V* (2009) ERPs studies of cognitive processing during sleep. Int J Psychol 44(4): 290–304.
https://doi.org/10.1080/00207590802194234
10. *Наумова ИВ, Гадалева СВ, Пашков АВ* (2018) Стационарные слуховые потенциалы. Обзор литературы. Рос оториноларингол 3(94): 115–129. [*Naumova IV, Gadaleva SV, Pashkov AV* (2018) Auditory steadystate responses. Literature review. Russ Otorhinolaryngol 3:115–128. (In Russ)].
https://doi.org/10.18692/1810-4800-2018-3-115-129
11. *Pratt H, Starr A, Michalewski HJ, Dimitrijevic A, Bleich N, Mittelman N* (2010) A comparison of auditory evoked potentials to acoustic beats and to binaural beats. Hear Res 262(1–2): 34–44.
https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.01.013
12. *Кулаичев АП* (2019) Компьютерная электрофизиология и функциональная диагностика. М ИНФРА-М. [Kulaichev AP (2019) Computer electrophysiology and functional diagnostics. M Infra-M. (In Russ)].
https://doi.org/10.12737/textbook_5c4567cb83fa36.41159592
13. *Huang TL, Charyton C* (2008) A comprehensive review of the psychological effects of brainwave entrainment. Altern Ther Health M 14(5): 38–50.
14. *Lustenberger C, Patel YA, Alagapan S, Page JM, Price B, Boyle MR, Fröhlich F* (2018) High-density EEG characterization of brain responses to auditory rhythmic stimuli during wakefulness and NREM sleep. Neuroimage 169: 57–68.
https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.12.007
15. *Lins OG, Picton TW* (1995) Auditory steady-state responses to multiple simultaneous stimuli. Electr Clin Neurol 96(5): 420–432.
https://doi.org/10.1016/0168-5597(95)00048-W

16. *Górska U, Binder M* (2019) Low and medium frequency auditory steady-state responses decrease during NREM sleep. Int J Psychophysiol 135: 44–54. https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2018.11.003
17. *Suzuki T, Kobayashi K, Umegaki Y* (1994) Effect of natural sleep on auditory steady state responses in adult subjects with normal hearing. Audiology 33(5): 274–279. https://doi.org/10.3109/00206099409071887
18. *Picton TW, John MS, Purcell DW, Plourde G* (2003) Human auditory steady-state responses: the effects of recording technique and state of arousal. Anesth Analg 97(5): 1396–1402. https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000082994.22466.DD
19. *Shumov DE, Tkachenko ON, Yakovenko IA, Dorokhov VB* (2021) Auditory Steady State Response to the Music with Embedded Binaural Beats during Daytime Sleep. Moscow Univ Biol Sci Bull 76: 41–45. https://doi.org/10.3103/S0096392521020061
20. *Ross B, Draganova R, Picton TW, Pantev C* (2003) Frequency specificity of 40-Hz auditory steady-state responses. Hear Res 186(1–2): 57–68. https://doi.org/10.1016/ S0378-5955(03)00299-5
21. *Berry RB, Brooks R, Gamaldo CE, Harding SM, Marcus C, Vaughn BV* (2012). The AASM manual for the scoring of sleep and associated events. Rules, Terminology and Technical Specifications, Darien, Illinois, Am Acad Sleep Med.

The Brain as an Adaptive Filter: Auditory Steady State Response to Sound Stimuli Containing Binaural Beats during Human Nap

D. E. Shumov[a, *], D. S. Sveshnikov[b], E. B. Yakunina[b], Z. V. Bakaeva[b], O. V. Mankaeva[b], and V. B. Dorokhov[a]

[a] *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

[b] *Medical Institute of Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia*

**e-mail: dmitry-shumov@yandex.ru*

"Binaural beats" (BB) is a type of sound stimulus being studied as non-invasive tools to promote sleep. BB is a sensation occuring when two monotonous sounds of slightly different pitch are supplied to the listener's right and left ear separately. This type of stimulation has the advantage to be perceived even at very low sound volumes essentially bordering the hearing threshold, so such a stimulus creates little disturbance to sleep. However, the patterns of its effect are difficult to study due to the weakness of electric brainwave response. The purpose of present paper is to check applicability of the brainwave entrainment hypothesis to auditory stimuli with embedded BB delivered during short-term human nap. The results demonstrate variability of auditory steady state response (ASSR) depending on BB frequency of the stimulus as well as on sleep stage that is not envisaged by the above hypothesis. It should be taken into account when predicting the effect of BB-based noninvasive sleep aids. Furthermore, the analysis of ASSR spectra allows the hypothesis to be put that the human brain falling asleep is a self-adjusting system in relation to incoming sound stimuli, for it strengthens the elements of auditory response which contribute to deepening of naturally evolving sleep.

Keywords: binaural beats, auditory event related potentials, auditory steady state response, nap, insomnia

EDN: MPJJSE
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 8, с. 970–983

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ V_{1a}-РЕЦЕПТОРОВ НА ОСМОРЕГУЛИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ПОЧЕК У ГИПЕРТИРЕОИДНЫХ КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ВАЗОПРЕССИНА В КРОВИ

© 2022 г. П. Д. Правикова[1, *], Л. Н. Иванова[1]

[1] *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*
**E-mail: PollyPravi@yandex.ru*

Поступила в редакцию 21.06.2022 г.
После доработки 19.07.2022 г.
Принята к публикации 19.07.2022 г.

Исследовано влияние блокады V_{1a}-рецепторов ($V_{1a}R$) вазопрессина (ВП) на осморегулирующую функцию почек у крыс линии WAG и у вазопрессин-дефицитных крыс линии Brattleboro в условиях моделирования гипертиреоза при потреблении раствора L-тироксина. Установлено, что у крыс обеих линий гипертиреоз на фоне ускорения скорости клубочковой фильтрации приводит к развитию диуретического ответа. У крыс Brattleboro, в отличие от особей WAG, увеличение скорости мочеотделения обусловлено снижением реабсорбции осмотически свободной воды относительно контроля. Направленность изменений натрийуретической функции почек при потреблении L-тироксина определяется уровнем эндогенного ВП в крови: у гипертиреоидных крыс WAG фиксируется натрийуретическая реакция, в то время как у вазопрессин-дефицитных крыс Brattleboro выявлен антинатрийурез вследствие прямого стимулирующего влияния тиреоидных гормонов на реабсорбцию натрия. Торможение реабсорбции натрия у крыс WAG при моделировании гипертиреоза устранялось блокадой ($V_{1a}R$). Предполагается, что стимуляция $V_{1a}R$ на фоне гипертиреоза играет ключевую роль в торможении реабсорбции натрия, тогда как ВП-независимый эффект тиреоидных гормонов направлен на активацию транспорта натрия и подавление реабсорбции воды.

Ключевые слова: тироксин, гипертиреоз, $V_{1a}R$, вазопрессин, линии крыс WAG и Brattleboro, осморегулирующая функция почек

DOI: 10.31857/S0869813922080064

В системе регуляции осмотического гомеостаза у млекопитающих главная роль принадлежит почке, способной в широких пределах варьировать реабсорбцию воды и натрия благодаря действию ряда системных гормонов при изменении объема или осмолярности внеклеточной жидкости [1]. Вазопрессин (ВП) является основным фактором в системе регуляции процесса осмотического концентрирования у млекопитающих, определяющим интенсивность трансэпителиального транспорта воды и ионов натрия в собирательных трубках почки [2, 3]. Щитовидная железа, секретирующая тиреоидные гормоны, участвует в регуляции водно-электролитного гомеостаза, влияя на почечную гемодинамику [4, 5], а также на экскрецию солей и воды [6]. Дисфункция щитовидной железы является причиной значительных изменений в регуляции концентрирующей функции почек, механизмы которых недостаточно изучены [7]. В условиях гипертиреоза на фоне ускорения клубочковой

фильтрации [8] установлено снижение эффективности осмотического концентрирования [9], несмотря на увеличение концентрации ВП в крови [10, 11]. При значительном увеличении секреции ВП, как известно, достигается порог активации V_{1a}-рецепторов ($V_{1a}R$), трансдукция сигнала которых приводит к торможению реабсорбции натрия [12, 13] и воды [14], снижая, тем самым, концентрирующую функцию почек. Предполагается, что осмотический диурез, фиксируемый при гиперсекреции щитовидной железы [15], обусловлен стимуляцией $V_{1a}R$ вследствие увеличения секреции эндогенного ВП. Целью настоящей работы явилось исследование участия V_{1a}-рецепторов в регуляции процесса осмотического концентрирования при моделировании гипертиреоза у крыс с различным уровнем ВП в крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использованы крысы в возрасте 60 дней и массой 150–200 г из вивария конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН, содержавшиеся в условиях стандартного рациона со свободным доступом к питьевой воде и сухому корму. Эксперименты проведены на крысах инбредной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) с высоким уровнем ВП в крови, а также на гомозиготных крысах Brattleboro, лишенных ВП вследствие мутации гена, кодирующего предшественник гормона [16]. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения РФ № 267 от 19.06.2003), а также с учетом международных рекомендаций по работе с экспериментальными животными.

Животные каждой линии были разделены на 4 экспериментальные группы (по 9 особей в каждой): 1) контрольная группа крыс, получавшая для питья дистиллированную воду; 2) крысы в условиях моделирования гипертиреоза путем замены питьевой воды на раствор L-тироксина; 3) крысы, потреблявшие дистиллированную воду, которым вводили селективный антагонист $V_{1a}R$; 4) гипертиреоидная группа крыс с блокадой $V_{1a}R$. При моделировании гипертиреоза крысы WAG потребляли в течение 21 дня раствор (LT4, эутирокс, Merk, Германия) с концентрацией 12 мг/л L-тироксина [17]. Учитывая межлинейные различия в суточном объеме потребляемой жидкости, для уравнивания суточной дозы препарата особи Brattleboro, характеризовавшиеся полидипсией, получали для питья раствор L-тироксина с концентрацией 1.6 мг/л. Для выявления роли $V_{1a}R$ в регуляции процесса осмотического концентрирования при моделировании гипертиреоза крысам, потреблявшим L-тироксин, в течение последних экспериментальных суток внутрибрюшинно вводили селективный антагонист $V_{1a}R$ [d(CH2)$_5$Tyr(Me^2)]AVP (V-2255, Sigma, США), дважды в дозе 2 мкг/100 г массы тела [18]. Вместе с тем для исследования эффекта влияния $V_{1a}R$ на концентрирующую функцию почек в зависимости от уровня активности тиреоидной системы селективный антагонист $V_{1a}R$ вводился особям обеих линий, содержавшихся в условиях стандартного потребления воды. У крыс обеих линий, потреблявших как дистиллированную воду, так и раствор L-тироксина, контролем к введению антагониста $V_{1a}R$ служило внутрибрюшинное введение раствора хлорида натрия для инфузий объемом 0.1 мл/100 г массы тела, дважды в течение последнего экспериментального дня.

В течение всего экспериментального периода ежедневно подсчитывали объем выпитой жидкости. Каждую неделю животных взвешивали и на 2 ч помещали в индивидуальные клетки с проволочным дном для сбора спонтанно экскретируемой мочи. Через 30 мин после последней инъекции животных помещали в индивидуальные клетки с проволочным дном для сбора спонтанно выделяющейся мочи и

оценки функции почек. По окончании эксперимента животных анестезировали тиопенталом натрия (10 мг/100 г массы тела, внутрибрюшинно) и забирали пробы крови.

Осмоляльность мочи и сыворотки крови измеряли криоскопическим методом (миллиосмометр ОСКР-1М КИВИ, Россия). Концентрацию креатинина в моче и сыворотке крови определяли методом Яффе на спектрофотометре (BioPhotometr plus, Eppendorf, Германия, 490 нм), скорость клубочковой фильтрации (СКФ) рассчитывали по клиренсу эндогенного креатинина. Концентрацию общего уровня тетрайодтиронина (Т4) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (Rat thyroxine (T4) ELISA Kit, Cusabio, CSB-E05082r). Содержание катионов натрия в пробах мочи и сыворотке крови измеряли методом пламенной фотометрии (Flame photometer 410 Sherwood, Великобритания). По стандартным формулам рассчитывали клиренс осмотически активных веществ ($C_{осм}$), максимальную реабсорбцию осмотически свободной ($T^{C}_{H_2O}$), воды экскрецию натрия (E_{Na}) и экскретируемую фракцию натрия (FE_{Na}). Все параметры вычисляли по стандартным формулам на 100 г массы тела.

Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий оценивали в программе Statistica 8.0 с помощью апостериорного LSD критерия Фишера для множественных сравнений. Для парного сравнения средних между линиями крыс применялся критерий Стьюдента для независимых выборок. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У крыс WAG, содержавшихся в течение 3-х недель в условиях потребления раствора L-тироксина, было выявлено значительное увеличение общего уровня Т4 (рис. 1). Учитывая ранее выявленный увеличенный уровень секреции ВП при гиперфункции щитовидной железы [11], для оценки значимости ВП в регуляции процесса осмотического концентрирования при гипертиреозе была предпринята серия экспериментов на гомозиготных ВП-дефицитных крысах Brattleboro. Базальный уровень Т4 в сыворотке крови у контрольных групп WAG и Brattleboro был достаточно высоким и не имел межлинейных различий (рис. 1), тогда как при моделировании гипертиреоза увеличение общего уровня Т4 было более выражено у ВП-дефицитных крыс Brattleboro (рис. 1).

У контрольных крыс линии WAG и Brattleboro, а также у гипертиреоидных особей обеих линий был зафиксирован прогрессирующий рост массы тела (рис. 2). У крыс WAG динамика массы тела в течение трех недель моделирования гипертиреоза была аналогична группе, потреблявшей дистиллированную воду (рис. 2*a*), тогда как у гипертиреоидных ВП-дефицитных крыс Brattleboro рост массы тела был существенно замедлен по сравнению с контрольными особями (рис. 2*b*). В то же время масса тела в группах крыс с гипертиреозом по истечении 3 недель эксперимента не имела межлинейных различий (рис. 2).

Использованные в экспериментах крысы Brattleboro потребляли за сутки более 80 мл жидкости, что характерно для ВП-дефицитных гомозигот [19]. В то же время крысы WAG с нормальным уровнем ВП в крови выпивали за сутки не более 12 мл воды. У крыс этой линии при моделировании гипертиреоза на второй неделе было выявлено достоверное увеличене суточного потребления жидкости, которое достигло максимума к окончанию эксперимента (рис. 3a). Вместе с тем у гипертиреоидной группы ВП-дефицитных особей линии Brattleboro потребление жидкости в сутки существенно возросло уже по истечении первой недели, и этот уровень сохранился до конца эксперимента (рис. 3b).

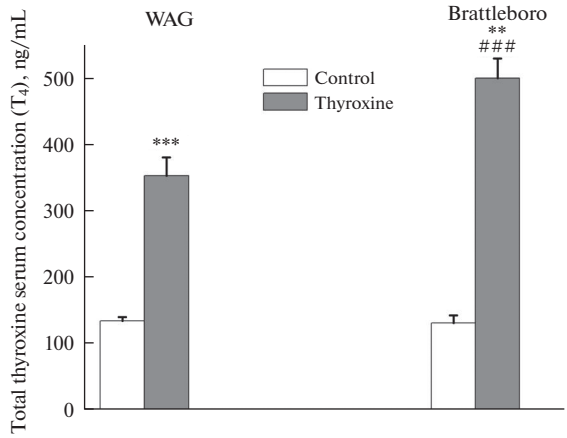


Рис. 1. Концентрация гормона T4 в сыворотке крови крыс линии WAG и ВП-дефицитной линии Brattleboro в контрольных условиях и при потреблении раствора L-тироксина (гипертиреоз).
Достоверность различий: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс WAG; $^{###}p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс Brattleboro.

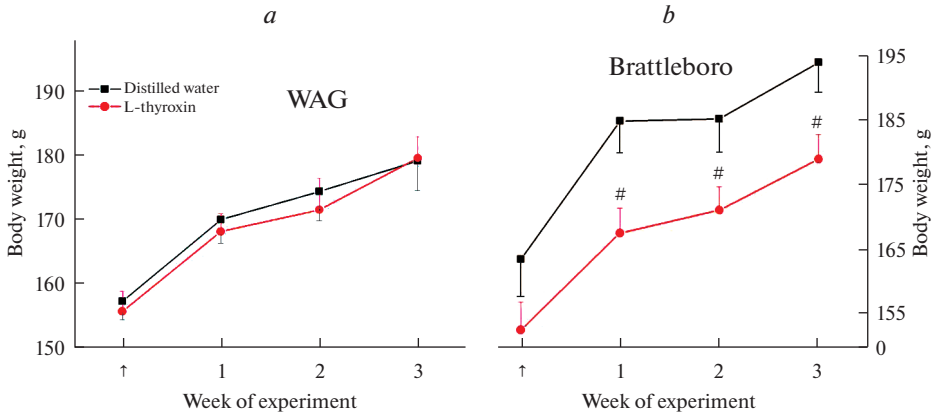


Рис. 2. Динамика массы тела в течение 3 нед. у крыс линии WAG (*a*) и ВП-дефицитной линии Brattleboro (*b*) в условиях потребления раствора L-тироксина по сравнению с контрольными особями.
Достоверность различий: $^{\#}p < 0.05$ – сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro.

Гидруретическая функция почек у контрольных крыс линий WAG и крыс Brattleboro существенно различалась (табл. 1). Крысы WAG характеризовались низкой скоростью мочеотделения и положительными значениями показателей реабсорбции осмотически свободной воды, отражающими высокий уровень эндогенного ВП. В то же время контрольные ВП-дефицитные особи линии Brattleboro характеризовались увеличенным диурезом вследствие высокого уровня скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и отрицательных показателей реабсорбции осмотически свободной воды (табл. 1). Нарушение питьевого поведения, наблюдаемое у крыс обеих линий при потреблении L-тироксина, отразилось на параметрах гидрурети-

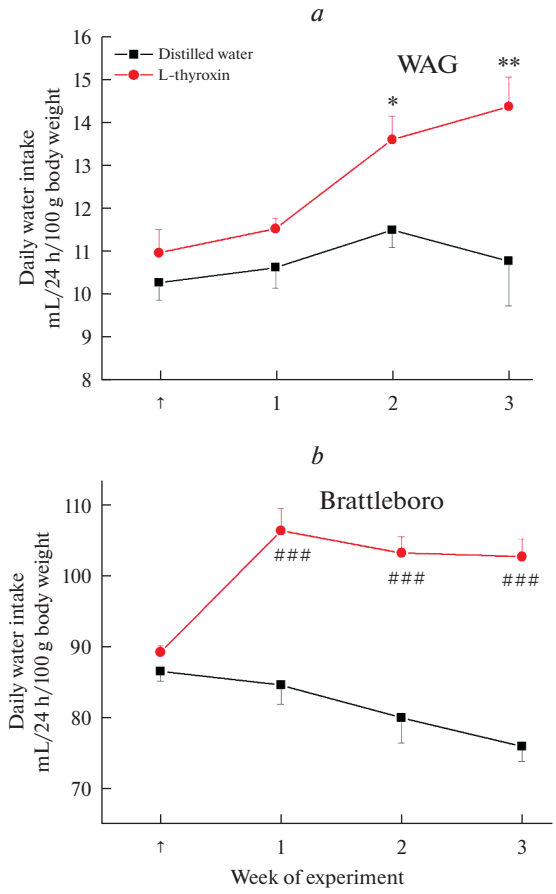


Рис. 3. Изменение суточного потребления жидкости в течение 3 нед. у крыс линии WAG (*a*) и ВП-дефицитной линии Brattleboro (*b*) в условиях потребления раствора L-тироксина по сравнению с контрольными особями.

Достоверность различий: $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$ – сравнение с контрольными показателями крыс WAG; $^{###}p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro.

ческой функции (рис. 4). Моделирование гипертиреоза у крыс WAG привело к увеличению скорости мочеотделения и СКФ без существенных изменений параметров реабсорбции воды (рис. 4, 5). В то же время у ВП-дефицитных крыс Brattleboro диуретический ответ (рис. 4a), зафиксированный на фоне увеличения СКФ (рис. 5), сопровождался снижением показателей реабсорбции осмотически свободной воды (рис. 4b).

Принимая во внимание увеличение концентрации ВП в крови при гипертиреозе [11], исследована роль $V_{1a}R$ в регуляции концентрирующей функции почек, поскольку при значительном увеличении уровня секреции ВП достигается порог активации этих рецепторов [12]. Устранение действия $V_{1a}R$ у гипертиреоидных крыс WAG приводило к достоверному снижению диуреза без существенных изменений показателя реабсорбции осмотически свободной воды (рис. 4), тогда как блокада $V_{1a}R$ в условиях эутиреоза не влияла на параметры гидруретической функции

Таблица 1. Влияние блокады $V_{1a}R$ на скорость клубочковой фильтрации и гидруретическую функцию почек у крыс линий WAG и Brattleboro

Параметр	Экспериментальные группы			
	WAG		Brattleboro	
	контроль	$V_{1a}R$ антагонист	контроль	$V_{1a}R$ антагонист
Диурез (V), мкл/мин	1.72 ± 0.23	1.18 ± 0.27	8.0 ± 1.58***	15.35 ± 1.83
Скорость клубочковой фильтрации (СКФ), мл/мин	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.04	0.36 ± 0.04***	0.47 ± 0.06
Реабсорбция осмотически свободной воды ($T^C_{H_2O}$), мкл/мин	6.74 ± 0.83	5.18 ± 0.9	–4.63 ± 1.04***	–3.78 ± 1.33

Все значения представлены как среднее ± ошибка среднего. Достоверность различий: *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой крыс линии WAG.

(табл. 1). Вместе с тем введение селективного антагониста $V_{1a}R$ ВП-дефицитным крысам Brattleboro закономерно не вызывало значимых изменений параметров гидруреза как в условиях гипертиреоза (рис. 4), так и на фоне нормального уровня секреции Т4 (табл. 1).

Контрольные показатели натрийуретической функции имели существенные межлинейные различия (табл. 2). У ВП-дефицитных крыс Brattleboro клиренс осмотически активных веществ, а также экскретируемая фракция натрия и скорость его экскреции были существенно выше аналогичных показателей у крыс WAG с высоким уровнем ВП в крови. Вместе с тем введение антагониста $V_{1a}R$ способствовало у крыс WAG снижению уровня осмоляльного очищения вследствие уменьшения экскретируемой фракции и скорости экскреции натрия, тогда как параметры натрийуреза у крыс Brattleboro оставались без изменений (табл. 2).

Потребление раствора L-тироксина приводило к изменению параметров натрийуретической функции, направленность которых зависела от уровня эндогенного ВП в крови (рис. 6). У крыс WAG на фоне гипертиреоза был зафиксирован рост клиренса осмотически активных веществ в результате увеличения скорости экскреции натрия, а также его экскретируемой фракции, что указывает на торможение реабсорбции катиона. В то же время у ВП-дефицитных особей Brattleboro была установлена антинатрийуретическая реакция вследствие усиления реабсорбции натрия, о чем свидетельствовало снижение его экскреции и экскретируемой фракции. Результаты позволяют заключить, что высокий уровень эндогенного ВП, характерный для гипертиреоза [11], способствует торможению реабсорбции натрия. Предполагалось, что установленный осмотический диурез при моделировании гипертиреоза у крыс WAG обусловлен стимуляцией $V_{1a}R$ вследствие увеличения секреции эндогенного ВП. Селективная блокада $V_{1a}R$ вызвала принципиально иную реакцию почек у гипертиреоидных крыс WAG: на фоне введения антагониста $V_{1a}R$ было зафиксировано снижение клиренса осмотически активных веществ вследствие снижения экскретируемой фракции натрия и скорости его экскреции (рис. 6). Вместе с тем устранение действия $V_{1a}R$ у ВП-дефицитных крыс Brattleboro, потреблявших раствор L-тироксина, не вызывало значимых изменений параметров натрийуретической функции (рис. 6).

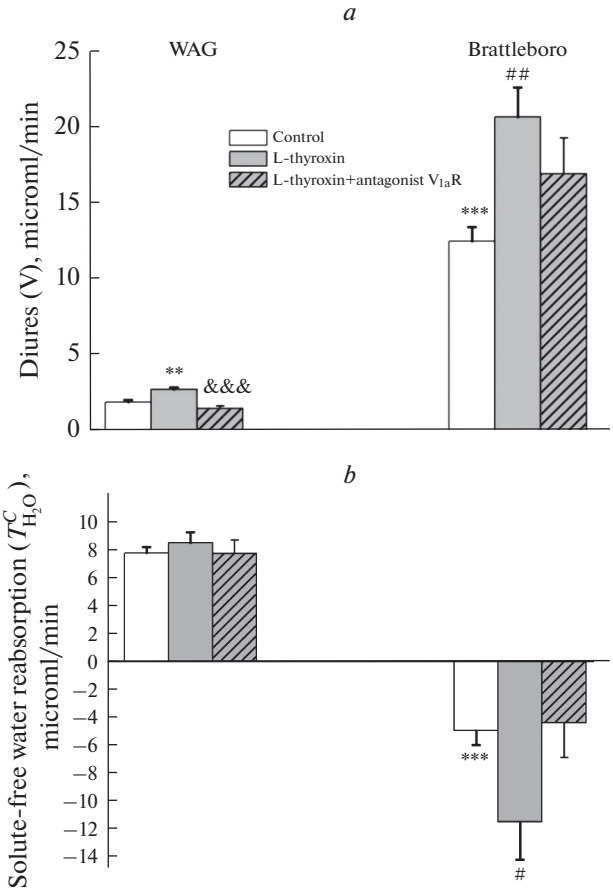


Рис. 4. Эффект блокады $V_{1a}R$ на параметры гидруретической функции почек при моделировании гипертиреоза L-тироксином у крыс WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$)/*a* – скорость мочеотделения, диурез (V); *b* – реабсорбция осмотически свободной воды ($T^C_{H_2O}$).

Достоверность различий: $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс WAG; $^{\&\&\&}p < 0.001$ – сравнение с гипертиреоидной группой WAG; $^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.01$ – сравнение с контрольными показателями линии Brattleboro.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основная функция тиреоидных гормонов – поддержание уровня основного обмена, а также участие в регуляции роста и развития организма как в условиях пренатального развития, так и в постнатальном периоде [20, 21]. У крыс WAG потребление раствора L-тироксина, сопровождавшееся ростом концентрации T4 в сыворотке крови, не привело к изменениям динамики массы тела по сравнению с контрольными особями WAG. В то же время у гипертиреоидных ВП-дефицитных крыс Brattleboro рост массы тела был существенно замедлен по сравнению с контролем внутри линии. Учитывая более существенное увеличение концентрации общего T4 в сыворотке крови у крыс Brattleboro по сравнению с особями WAG,

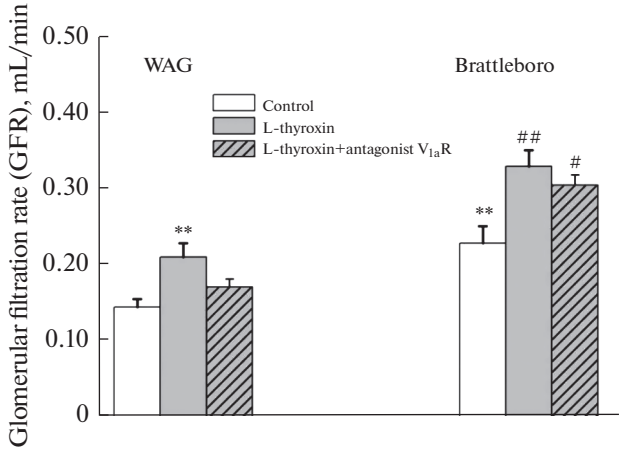


Рис. 5. Эффект блокады $V_{1a}R$ на скорость клубочковой фильтрации (СКФ) при моделировании гипертиреоза L-тироксином у крыс WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$).

Достоверность различий: $^{**}p < 0.01$ – сравнение с контрольными показателями крыс WAG; $^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.01$ – сравнение с контрольными показателями линии Brattleboro.

сниженный темп изменения массы тела у этой линии является следствием стимулирующего влияния Т4 на скорость основного обмена [21]. Гипертиреоз, как известно, характеризуется снижением массы тела на фоне увеличения скорости липолиза и глюконеогенеза [20, 22]. Кроме того, принимая во внимание изменения у крыс Brattleboro количества рецепторов соматотропного гормона (СТГ) в печени, а также снижение активности в плазме крови фактора, опосредующего действие СТГ, соматомедина [23], можно предположить, что данная линия более чувствительна к любым изменениям регуляции роста. Вместе с тем у крыс WAG наличие эндогенного ВП в крови, по-видимому, явилось фактором, компенсирующим усиление скорости основного обмена организма на фоне потребления раствора L-тироксина.

Таблица 2. Влияние блокады $V_{1a}R$ на натрийуретическую функцию почек у крыс линий WAG и Brattleboro

Параметр	Экспериментальные группы			
	WAG		Brattleboro	
	контроль	$V_{1a}R$ антагонист	контроль	$V_{1a}R$ антагонист
Клиренс осмотически активных веществ ($C_{осм}$), мкл/мин	8.91 ± 0.69	4.95 ± 0.82**	14.02 ± 1.61**	12.94 ± 2.53
Скорость экскреции натрия (E_{Na}), мкл/мин	0.03 ± 0.007	0.008 ± 0.002**	0.16 ± 0.02**	0.12 ± 0.06
Экскретируемая фракция натрия (FE_{Na}), %	0.14 ± 0.03	0.03 ± 0.01*	0.27 ± 0.03*	0.18 ± 0.07

Все значения представлены как среднее ± ошибка среднего. Достоверность различий: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – сравнение с контрольной группой крыс линии WAG.

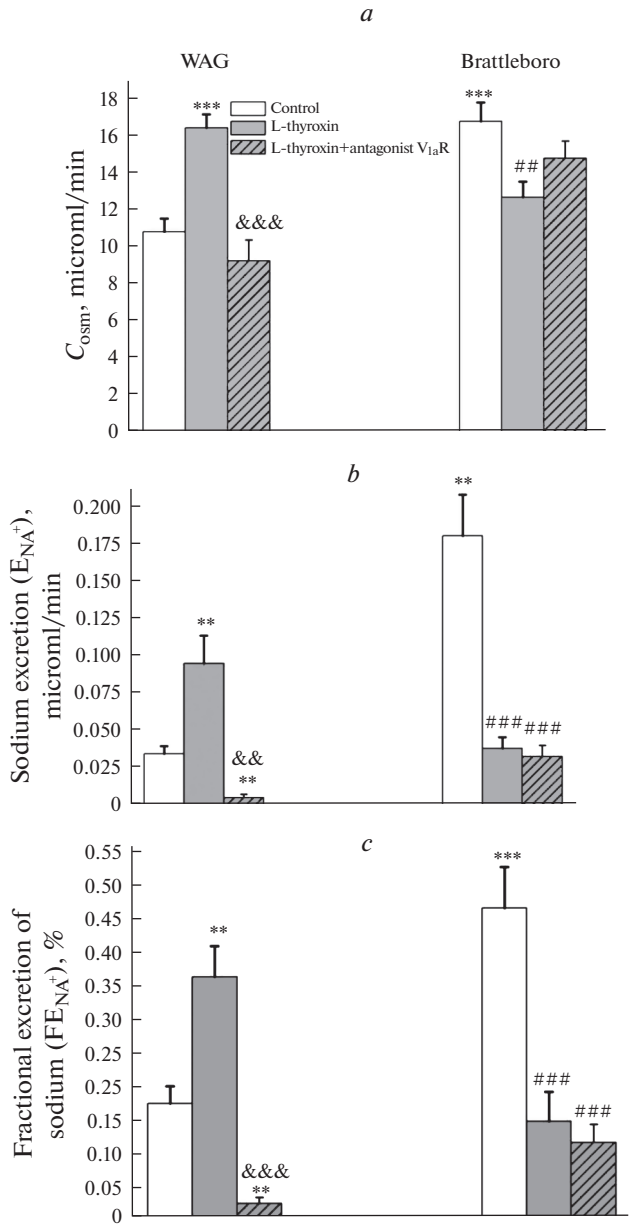


Рис. 6. Эффект блокады $V_{1a}R$ на параметры натрийуретической функции почек в условиях моделирования гипертиреоза L-тироксином у крыс WAG и Brattleboro ($M \pm SEM$).

a – показатель осмотического очищения ($C_{осм}$); *b* – скорость экскреции натрия (E_{Na}); *c* – экскретируемая фракция натрия (FE_{Na}).

Достоверность различий: $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс WAG; $^{\&\&}p < 0.01$; $^{\&\&\&}p < 0.001$ – сравнение с гипертиреоидной группой WAG; $^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$ – сравнение с контрольными показателями крыс линии Brattleboro.

Гормоны щитовидной железы участвуют в регуляции концентрирующей функции почек, и нарушения уровня их секреции приводят к существенным перестройкам процесса осмотического концентрирования вследствие изменения экскреции солей и воды [6, 24], а также почечной гемодинамики [8]. Ранее было установлено, что при гиперфункции щитовидной железы наблюдается стимуляция чувства жажды при увеличенном уровне секреции ВП [25]. Вместе с тем вне зависимости от базального уровня эндогенного ВП в крови у гипертиреоидных крыс WAG и Brattleboro установлено увеличение суточного потребления жидкости, что, по всей видимости, явилось следствием активации гипоталамического центра жажды при нарастании гипертоничности жидкости внеклеточного пространства [26]. Нарушение питьевого поведения у крыс линий WAG и Brattleboro отразилось на параметрах гидруретической функции при потреблении L-тироксина. Моделирование гипертиреоза у крыс WAG привело к увеличению скорости мочеотделения вследствие ускорения СКФ без существенных изменений реабсорбции воды в связи с преобладающим влиянием ВП на параметры осмотического концентрирования. Вместе с тем у ВП-дефицитных крыс Brattleboro зафиксированный на фоне ускорения СКФ диуретический ответ был обусловлен снижением реабсорбции осмотически свободной воды вследствие тонического ингибирующего влияния тиреоидных гормонов на концентрирующую функцию почек. Выявленное усиление диуретической реакции у крыс Brattleboro в условиях гипертиреоза подтверждает ранее установленные данные о развитии полиурии, которая была следствием снижения экспрессии аквапоринов AQP1 и AQP2 в корковом и мозговом веществе почки на фоне хронического потребления тироксина [15]. Ингибирующий эффект гипертиреоза на реабсорбцию воды согласуется с ранее установленным усилением эффективности осмотического концентрирования у ВП-дефицитных крыс Brattleboro при подавлении секреции Т4 [27].

Реабсорбция натрия осуществляется эпителием всех сегментов нефрона и собирательных трубок и находится под контролем комплекса гормональных факторов [28]. Известно, что тиреоидные гормоны регулируют работу многих ионных транспортеров, преимущественно в проксимальном сегменте нефрона, усиливая как активность Na-P-котранспортера [29], Na-H-обменника [30] и Na/K-насоса [31], а также стимулируя экспрессию NKCC2-котранспортера в толстом восходящем колене петли Генле [15]. Установлено, что направленность изменений параметров натрийуретической функции почек в условиях моделирования гипертиреоза применением L-тироксина зависит от уровня эндогенного ВП в крови. У крыс WAG с высоким базальным уровнем эндогенного ВП в условиях гипертиреоза был зафиксирован натрийуретический ответ вследствие торможения реабсорбции натрия, в то время как у ВП-дефицитных особей Brattleboro, напротив, установлена антинатрийуретическая реакция. По всей видимости, зафиксированное усиление реабсорбции натрия у крыс линии Brattleboro в условиях моделирования гипертиреоза было обусловлено прямым стимулирующим влиянием Т4 на активность и экспрессию натриевых каналов, в том числе в дистальных сегментах нефрона [9, 15]. Вместе с тем известно, что при гиперсекреции щитовидной железы подавляется по принципу обратной связи секреция тиреотропного гормона (ТТГ) [32]. Почечная ткань является одной из мишеней действия ТТГ, поскольку в ней экспрессируются рецепторы к этому гормону (TSHR): в сосудах, включая артериолы клубочка, а также в эпителии почечных канальцев [33, 34]. При связывании лиганда с TSHR передача сигнала может проходить при стимуляции как G_s-, так и G_q-белка: при низких концентрациях ТТГ активируется цАМФ-путь, тогда как при высоких концентрациях гормона трансдукция сигнала идет по инозитол-фосфатному сигнальному пути [35, 36]. Таким образом, подавление секреции ТТГ у гипертиреоидных крыс Brattleboro, приводящее к активации цАМФ-зависимого сигнального каскада [37], способствовало, по всей видимости, стимуляции транспорта натрия в эпителии

почечных канальцев. Известно, что активация цАМФ-зависимого пути усиливает транспорт натрия, стимулируя экспрессию эпителиального натриевого канала, ENaC [38], а также NKCC2-котранспортера в толстом восходящем колене петли Генле [39]. В то же время у гипертиреоидных крыс WAG выявленное торможение реабсорбции натрия, как предполагалось, было обусловлено увеличением уровня секреции ВП [11] и интеграцией эффектов, опосредованных его рецепторами. ВП оказывает существенное влияние на транспорт натрия в эпителии почечных канальцев [38, 40], направленность которого зависит от концентрации гормона в крови и определяется стимуляцией определенного типа рецептора ВП [13, 38]. Известно, что при увеличении секреции ВП, например, в условиях дегидратации, активируются на апикальной мембране эпителиоцитов собирательных трубок почек V_{1a}-рецепторы, трансдукция сигнала которых по фосфолипазному пути [41] приводит к торможению реабсорбции натрия и усилению скорости его выведения [12]. Принимая во внимание, что обнаруженный осмотический диурез у гипертиреоидных крыс WAG, очевидно, был обусловлен стимуляцией $V_{1a}R$, ускоряющих выведение натрия [12], была предпринята серия экспериментов с селективной блокадой $V_{1a}R$ на фоне моделирования гипертиреоза. Блокада $V_{1a}R$ у крыс WAG при повышенном уровне Т4, в отличие от крыс Brattleboro, привела к устранению ингибирующего эффекта гипертиреоза на реабсорбцию натрия, а также к снижению скорости мочеотделения. Вместе с тем торможение реабсорбции натрия при устранении действия $V_{1a}R$ было обнаружено у крыс WAG как при гиперфункции щитовидной железы, так и при нормальном уровне секреции Т4, что указывает на натрийуретический эффект стимуляции $V_{1a}R$ вне зависимости от эффективности работы щитовидной железы. В то же время независимо от уровня ВП в крови устранение действия $V_{1a}R$ при гипертиреозе не приводило к изменениям параметров факультативной реабсорбции воды, что подтверждает преимущественную роль $V_{1a}R$ в регуляции натрийуретической функции почки [12, 13].

Таким образом, при моделировании гипертиреоза установлено ВП-независимое подавление реабсорбции воды, тогда как наличие эндогенного ВП в крови устраняет ингибирующий эффект Т4 на реабсорбцию осмотически свободной воды. Вместе с тем направленность изменений параметров натрийуретической функции почек в условиях гипертиреоза зависит от уровня ВП в крови, что указывает на его существенную роль в подавлении реабсорбции натрия при гиперфункции щитовидной железы. Предполагается, что торможение реабсорбции натрия, несмотря на прямой стимулирующий эффект Т4 на транспорт натрия, определяется уровнем ВП в крови и преобладанием эффектов V_{1a}-рецепторов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-04-00298 А), а также за счет средств бюджетного финансирования по государственному заданию № FWNR-2022-0007.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Л.Н.И.), планирование эксперимента (Л.Н.И., П.Д.П.), сбор данных (П.Д.П.), обработка данных (П.Д.П.), написание манускрипта (Л.Н.И., П.Д.П.), редактирование манускрипта (Л.Н.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schrier RW* (2008) Vasopressin and aquaporin 2 in clinical disorders of water homeostasis. Semin Nephrol 28: 289–296.
https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2008.03.009
2. *Agre P, King L., Yasui M, Guggino WmB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S* (2002) Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. J Physiol 542: 3–16.
https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.020818
3. *Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PMT, Kohan DE* (2015) Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. Clin J Am Soc Nephrol 10: 135–146.
https://doi.org/10.2215/CJN.05760513
4. *Syme HM* (2007) Cardiovascular and renal manifestations of hyperthyroidism. Vet Clin North Am Small Anim Pract 4: 723–743.
https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.05.011
5. *Vargas F, Moreno JM, Rodriguez-Gomez I, Wangensteen R, Osuna A, Alvarez-Guerra M, García-Estañ J* (2006) Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. Eur J Endocrinol 2: 197–212.
https://doi.org/10.1530/eje.1.02093
6. *Iglesias P, Bajo MA, Selgas R, Díez JJ (*2009*)* Thyroid dysfunction and kidney disease. Eur J Endocrinol 160: 503–515.
https://doi.org/10.1007/s11154-016-9395-7
7. *Iglesias P, Bajo MA, Selgas R, Díez JJ* (2017) Thyroid dysfunction and kidney disease: An update. Rev Endocr Metab Disord 18(1): 131–144.
https://doi.org/10.1007/s11154-016-9395-7
8. *den Hollander JG, Wulkan RW, Mantel MJ, Berghout A* (2005) Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function. Clin Endocrinol 62: 423–427.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2005.02236.x
9. *Basu G, Mohapatra A* (2012) Interactions between thyroid disorders and kidney disease. Indian J Endocrinol Metab 16(2): 204–213.
https://doi.org/10.4103/2230-8210.93737
10. *Marcisz C, Jonderko G, Kucharz EJ* (2001) Changes of plasma arginine–vasopressin level in patients with hyperthyroidism during treatment. Med Sci Monit 7: 409–414.
11. *Mogulkoc R, Baltaci AK* (2010) Effect of melatonin supplementation on plasma vasopressin response to different conditions in rats with hyperthyroidism induced by L-thyroxine. Regul Pept 61(1–3): 38–42.
https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.12.018
12. *Perucca J, Bichet DG, Bardoux P, Bouby N, Bankir L* (2008) Sodium excretion in response to vasopressin and selective vasopressin receptor antagonists. J Am Soc Nephrol 19: 1721–1731.
https://doi.org/10.1681/ASN.2008010021
13. *Golosova DV, Karavashkina TA, Kutina AV, Marina AS, Natochin YV* (2016) Effects of Selective Agonists of V1a, V2, and V1b Receptors on Sodium Transport in Rat Kidney. Bull Exp Biol Med 160(6): 751–754.
https://doi.org/10.1007/s10517-016-3301-x
14. *van Balkom BW, Savelkoul PJ, Markovich D, Hofman E, Nielsen S, van der Sluijs P, Deen PM* (2002) The role ofputative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of theaquaporin-2 water channel. J Biol Chem 277: 41473–41479.
https://doi.org/10.1074/jbc.M207525200
15. *Wang W, Li C, Summer SN, Falk S, Schrier RW* (2007) Polyuria of thyrotoxicosis: Downregulation of aquaporin water channels and increased solute excretion. Kidney Int 72: 1088–1094.
https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002475
16. *Valtin H, Schroeder HA* (1997) Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro rata).1964 [classical article]. J Am Soc Nephrol 8: 1333–1341.
https://doi.org/10.1681/ASN.V881333
17. *Jeddi S, Gholami H, Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A* (2019) Altered gene expression of hydrogen sulfide-producing enzymes in the liver and muscles tissues of hyperthyroid rats. J Cell Physiol 234(10): 17937–17945.
https://doi.org/10.1002/jcp.28426
18. *Picker O, Schwarte LA, Roth HJ, Greve J, Scheeren TW* (2004) Comparison of the role of endothelin, vasopressin and angiotensin in arterial pressure regulation during sevoflurane anaesthesia in dogs. Br J Anaesth 92(1): 102–108.
https://doi.org/10.1093/bja/aeh025
19. *Khegay II* (2003) Phenotypic expression of the mutant gene diabetes insipidus in rats and criteria of genotyping by phenotype. Genetika 39(1): 70–74.
20. *Brent GA* (2008) Clinical practice. Graves' disease. N Engl J Med 358: 2594–2605.
https://doi.org/10.1056/NEJMcp0801880

21. *Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ* (2010) Molecular aspects of thyroid hormone actions. Endocr Rev 31: 139–170.
https://doi.org/10.1210/er.2009-0007
22. *Motomura K, Brent GA* (1998) Mechanisms of thyroid hormone action. Implications for the clinical manifestation of thyrotoxicosis. Endocrinol Metab Clin N Am 27: 1–23.
https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70294-2
23. *Bullier-Picard F, Wolf BA, Hugues JN, Durand D, Voirol MJ, Charrier J, Czernichow P, Postel-Vinay MC* (1985) The Brattleboro rat: normal growth hormone secretion, decreased hepatic growth hormone receptors and low plasma somatomedin activity. Mol Cell Endocrinol 45(1): 49–56.
https://doi.org/10.1016/0303-7207(86)90081-X
24. *Mariani LH, Berns JS* (2012) The renal manifestations of thyroid disease. J Am Soc Nephrol 23(1): 22–26.
https://doi.org/10.1681/ASN.2010070766
25. *Harvey JN, Nagi DK, Baylis PH, Wilkinson R, Belchetz PE* (1991) Disturbance of osmoregulated thirst and vasopressin secretion in thyrotoxicosis. Clin Endocrinol (Oxf) 35(1): 29–33.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1991.tb03492.x
26. *Egan G, Silk T, Zamarripa F, Williams J, Federico P, Cunnington R, Carabott L, Blair-West J, Shade R, McKinley M, Farrell M, Lancaster J, Jackson G, Fox P, Denton D* (2003) Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 15241–15246.
https://doi.org/10.1073/pnas.2136650100
27. *Pravikova PD, Ivanova LN* (2021) Effect of NO Synthesis Blockade on Renal Osmoregulatory Function in Methimazole-Induced Hypothyroid Rats with Different Vasopressin Blood Level. J Evol Biochem Phys 57: 1461–1470.
https://doi.org/10.1134/S0022093021060223
28. *Palmer LG, Schnermann J* (2015) Integrated control of Na transport along the nephron. Clin J Am Soc Nephrol 10(4): 676–687.
https://doi.org/10.2215/CJN.12391213
29. *Alcalde AI, Sarasa M, Raldúa D, Aramayona J, Morales R, Biber J, Murer H, Levi M, Sorribas V* (1999) Role of thyroid hormone in regulation of renal phosphate transport in young and aged rats. Endocrinology 140(4): 1544–1551.
https://doi.org/10.1210/endo.140.4.6658
30. *Baum M, Dwarakanath V, Alpern RJ, Moe OW* (1998) Effects of thyroid hormone on the neonatal renal cortical Na^+/H^+ antiporter. Kidney Int 5: 1254–1258.
https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00879.x
31. *Wijkhuisen A, Djouadi F, Vilar J, Merlet-Benichou C, Bastin J* (1995) Thyroid hormones regulate development of energy metabolism enzymes in rat proximal convoluted tubule. Am J Physiol 4(2): F634–F642.
https://doi.org/10.1152/ajprenal.1995.268.4.F634
32. *Allen MD, Neumann S, Gershengorn MC* (2011) Occupancy of both sites on the thyrotropin (TSH) receptor dimer is necessary for phosphoinositide signaling. FASEB J 25: 3687–3694.
https://doi.org/10.1096/fj.11-188961
33. *Beau I, Misrahi M, Gross B, Vannier B, Loosfelt H, Hai MT, Pichon C, Milgrom E* (1997) Basolateral localization and transcytosis of gonadotropin and thyrotropin receptors expressed in Madin-Darby canine kidney cells. J Biol Chem 272: 5241–5248.
https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.5241
34. *Sellitti DF, Akamizu T, Doi SQ, Kim GH, Kariyil JT, Kopchik JJ, Koshiyama H* (2000) Renal expression of two 'thyroid-specifific' genes: thyrotropin receptor and thyroglobulin. Exp Nephrol 8: 235–243.
https://doi.org/10.1159/000020674
35. *Neumann S, Malik SS, Marcus-Samuels B, Eliseeva E, Jang D, Klubo-Gwiezdzinska J, Krieger CC, Gershengorn MC* (2020) Thyrotropin Causes Dose-dependent Biphasic Regulation of cAMP Production Mediated by Gs and Gi/o Proteins. Mol Pharmacol 97(1): 2–8.
https://doi.org/10.1124/mol.119.117382
36. *Boutin A, Krieger CC, Marcus-Samuels B, Klubo-Gwiezdzinska J, Neumann S, Gershengorn MC* (2020) TSH Receptor Homodimerization in Regulation of cAMP Production in Human Thyrocytes *in vitro*. Front Endocrinol (Lausanne) 11: 276.
https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00276
37. *Pracyk JB, Slotkin TA* (1991) Thyroid hormone differentially regulates development of beta-adrenergic receptors, adenylate cyclase and ornithine decarboxylase in rat heart and kidney. J Dev Physiol 16(4): 251–261.
38. *Bankir L, Bichet DG, Bouby N* (2010) Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? Am J Physiol Renal Physiol 299: F917–F928.
https://doi.org/10.1152/ajprenal.00413.2010

39. *Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA* (2011) Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. Am J Physiol Renal Physiol 301: 1143–1159. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00396.2011
40. *Cheng CY, Chu JY, Chow BK* (2009) Vasopressin-independent mechanisms in controlling water homeostasis. J Mol Endocrinol 43: 81–92. https://doi.org/10.1677/JME-08-0123
41. *Koshimizu T, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue A* (2012) Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. Physiol Rev 92: 1813–1864. https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2011

Effect of V_{1a}-Receptor Blockade on Renal Osmoregulatory Function in L-Thyroxine-Induced Hyperthyroid Rats with Different Blood Vasopressin Levels

P. D. Pravikova[a], * and L. N. Ivanova[a]

[a] *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

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

The effect of V_{1a} receptor ($V_{1a}R$) blockade on the renal osmoregulatory function was studied in WAG and Brattleboro rats under L-thyroxin-induced hyperthyroidism. It was established that in both strains of rats hyperthyroidism promoted the development of a diuretic response due to an increase in glomerular filtration rate. In vasopressin-deficient Brattleboro rats, in contrast to the WAG strain, an increase in urinary flow rate is also due to a decrease in solute-free water reabsorption relative to control. The direction of changes in the renal natriuretic function with consumption of L-thyroxine is determined by blood AVP level: in hyperthyroid WAG rats a natriuretic reaction was established, while in vasopressin-deficient Brattleboro rats, antinatriuresis was detected due to direct stimulating effect of thyroid hormones on sodium reabsorption. Inhibition of sodium transport in WAG rats under hyperthyroidism was eliminated by blockade of $V_{1a}R$. It is assumed that stimulation of $V_{1a}R$ plays a key role in the inhibition of sodium reabsorption in L-thyroxine- induced hyperthyroidism, while the direct AVP-independent effect of the thyroid system is aimed at activation of sodium transport and suppression of water reabsorption.

Keywords: thyroxine, hyperthyroidism, vasopressin, V_{1a}-receptors, WAG, Brattleboro, renal osmoregulatory function

EDN: VAMLIQ
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 8, с. 984–996

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ИНДУКТОРА ШАПЕРОНОВ U133 НА ВРЕМЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИКЛА БОДРСТВОВАНИЕ–СОН И ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ПАМЯТЬ

© 2022 г. И. В. Екимова[1, *], Н. С. Курмазов[1], М. Б. Пази[1], М. В. Чернышев[1], С. Г. Полоник[2], Ю. Ф. Пастухов[1]

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

[2]*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия*

**E-mail: irina-ekimova@mail.ru*

Поступила в редакцию 17.06.2022 г.
После доработки 20.07.2022 г.
Принята к публикации 20.07.2022 г.

Индуктор шаперонов соединение U133, созданное на основе эхинохрома А, обладает противоопухолевой, антиоксидантной и нейропротективной активностью. Широта терапевтического действия вызывает большой интерес к этому соединению, поскольку на его основе в дальнейшем могут быть разработаны потенциальные лекарственные средства. Однако на сегодняшний день спектр биологической активности соединения U133 на функциональном уровне до конца не определен. В данном исследовании мы поставили перед собой задачу выяснить, сопряжено ли повышение содержания шаперона Hsp70 в головном мозге, достигаемое с помощью соединения U133, с изменением цикла бодрствование–сон и пространственной рабочей памяти у крыс популяции Вистар в естественных физиологических условиях. Проведенное исследование показало, что внутрибрюшинное введение соединения U133 приводит к возрастанию содержания шаперона Hsp70 (HSPA1) в структурах головного мозга, вовлеченных в механизмы регуляции сна–бодрствования и формирования памяти (голубое пятно, преоптическая область гипоталамуса, черная субстанция, вентральная тегментальная область среднего мозга). Повышение уровня Hsp70 в головном мозге было сопряжено с увеличением в 1.7 раза продолжительности парадоксального сна (ПС) в период с 12-го по 24-й ч после введения индуктора. Эти факты позволяют полагать, что эффект соединения U133 на представленность ПС реализуется с участием шаперона Hsp70. Несмотря на то что ПС может влиять на на различные виды памяти, мы не обнаружили значимого эффекта U133 на пространственную рабочую память. Соединение U133 может быть рекомендовано для дальнейшего исследования спектра биологической активности с целью прогнозирования его терапевтической эффективности при различных патологиях ЦНС и старении, когда нарушается сон и уменьшается экспрессия шаперонов в головном мозге.

Ключевые слова: соединение U133, шаперон Hsp70, головной мозг, парадоксальный сон, пространственная рабочая память, крысы

DOI: 10.31857/S0869813922080027

ВВЕДЕНИЕ

1,4-Нафтохиноны являются вторичными метаболитами растений и животных и необходимы для протекания многих биологических процессов. Их природные и синтетические производные демонстрируют широкий спектр биологической активности, который включает в себя противомикробное, антиоксидантное, нейропротекторное, кардио- и гепатопротекторное, антиишемическое и другие свойства [1–4]. Такой широкий терапевтический спектр вызывает большой интерес к этим соединениям, поскольку они представляют многообещающую платформу для поиска потенциальных лекарственных средств. Одними из них, синтезированными сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН, являются лекарственный препарат “Гистохром®” (2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон) и соединение U133 (ацетилированный трис-О-глюкозид эхинохрома), которые были созданы на основе эхинохрома А – пигмента морских ежей [5]. Гистохром как мощный антиоксидант более 10 лет применяется для лечения инфаркта миокарда и ишемической болезни сердца, а также в офтальмологии для лечения дегенерации роговицы, диабетической ретинопатии, травм и ожогов глаз [6, 7]. Он является скавенджером свободных радикалов, и хелатором катионов металлов, включая катионы кальция [8, 9].

Соединение U133 обладает противоопухолевой [10], антиокидантной активностью [11] и уникальной способностью активировать транскрипционный фактор теплового шока HSF1, что индуцирует усиление экспрессии ко-шаперона Hsp40 и гена индуцибельного белка теплового шока Hsp70 (*Hspa1*) [12, 13]. Проведенные недавно нами исследования показали, что применение терапии, основанной на системном введении U133, на моделях болезни Паркинсона (БП) у крыс среднего и пожилого возраста приводит к повышению уровня Hsp70 в нигростриатной системе, что сопровождается ослаблением развития α-синуклеиновой патологии, нейровоспаления и процесса нейродегенерации [12, 14]. Hsp70-индуцирующая активность соединения U133 может иметь хорошие перспективы в медицинской стратегии терапии конформационных патологий и других заболеваний, для которых характерна дезорганизация клеточных процессов. Это связано с тем, что шаперон Hsp70 является одним из центральных координаторов протеостазной сети, обеспечивая правильную конформацию белков, и защищает клетки от последствий неправильного фолдинга и агрегации белка [15]. Кроме того, обладая шаперонной активностью, Hsp70 вступает во взаимодействие с функциональными клеточными белками, что приводит к модификации различных регуляторных каскадов и синаптических процессов в ЦНС [16, 17]. Hsp70 участвует в процессах синтеза и доставки белков, необходимых для поддержания существующих синапсов и образования новых.

К настоящему времени растет количество исследований, указывающих на важную роль фактора транскрипции HSF1 и шаперона Hsp70 в молекулярных механизмах модуляции сна и процессах формирования памяти. Например, было продемонстрировано, что введение Hsp70 в преоптическую область гипоталамуса у крыс приводит к возрастанию представленности медленноволнового сна (МВС), а нокдаун Hsp70 к его уменьшению [18, 19]. В модели доклинической стадии БП у пожилых крыс фармакотерапия с индуктором шаперонов U133 препятствовала развитию гиперсомнии, корректировала показатели МВС и оказывало действие, подобное антидепрессантам [20, 21]. Показана взаимосвязь между функцией шаперона Hsp70 и формированием памяти. Об этом свидетельствует HSF1-зависимая индук-

Список сокращений: внутрибрюшинно (в/б), парадоксальный сон (ПС, REMS), медленноволновый сон (МВС), компактная часть черной субстанции (кчЧС), вентральная тегментальная область (ВТО), электроэнцефалограмма (ЭЭГ), электроокулограмма глазных мышц (ЭОГ), электромиограмма (ЭМГ), болезнь Паркинсона (БП), компактная часть черной субстанции (кчЧС), вентральная тегментальная область (ВТО).

ция Hsp70 при выполнении задач, связанных с обучением и памятью [17, 22, 23]. Куркумин, который действует как активатор HSF1, повышает уровень мозгового нейротрофического фактора (Brain-Derived Neurotrophic Factor – BDNF) в гиппокампе и уменьшает потерю рабочей и пространственной референтной памяти в модели болезни Альцгеймера у грызунов [24, 25]. Однако эффекты индуктора шаперонов соединения U133 на интегративные функции мозга, такие как сон и память, до сих пор не изучены в естественных физиологических условиях. Пока остаются неясными его ситуативные эффекты ("здесь и сейчас") и насколько они сопряжены с Hsp70-индуцирующей активностью соединения U133. Проведение таких исследований необходимо для дальнейшего выяснения спектра биологической активности соединения U133 на функциональном уровне.

В настоящей работе мы поставили перед собой задачу выяснить, сопряжено ли повышение содержания шаперона Hsp70 в головном мозге, достигаемое с помощью соединения U133, с изменением цикла бодрствование–сон и пространственной рабочей памяти у крыс в естественных физиологических условиях.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на крысах-самцах популяции Wistar в возрасте 7–8 мес., массой тела 370–420 г. До эксперимента животных содержали в стандартных условиях вивария ИЭФБ РАН по 5 особей в клетке при температуре окружающей среды 23 ± 1°C и свободном доступе к воде и пище. Во время проведения экспериментов животных содержали в одиночных клетках в экспериментальной комнате при температуре 23 ± 1°C, фотопериоде 12:12 ч (11:00–23:00 – свет) и свободном доступе к воде и пище. Манипуляции с животными соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям, утвержденным биоэтическим комитетом по охране животных ИЭФБ РАН.

Препараты. В опытах использовали индуктор шаперонов хиноидное соединение U133 (ацетилированный трис-O-глюкозид эхинохрома), которое было синтезировано в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН [26, 27]. Соединение U133 растворяли в 20 мкл DMSO и доводили до объема 200 мкл с помощью 0.9% раствора NaCl. U133 вводили животным внутрибрюшинно (в/б) в дозе 4 мг/кг в начале светлой фазы суток. Контрольной группе животных вводили растворитель (200 мкл 0.9% NaCl с добавлением 20 мкл DMSO).

Вестерн-блот. Изменение содержания Hsp70 оценивали методом Вестерн-блот в ткани преоптической области гипоталамуса, голубом пятне, компактной части черной субстанции (кчЧС)/вентральной тегментальной области (ВТО) среднего мозга через 12 и 24 ч после введения U133 или его растворителя. В каждой временной точке было не менее 3 животных. Пробы тканей головного мозга гомогенизировали и лизировали с использованием High RIPA буфера. Электрофорез проводился в 11% полиакриламидном геле, затем белки переносили на мембрану из поливинилидендифторида (PVDF-мембрану; Immun-Blot®, BIO RAD, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител мембраны инкубировали в течение 1 ч в блокирующем растворе (PBS с добавлением 0.1% Tween-20 и 3% бычьего сывороточного альбумина). Далее мембрану инкубировали с первичными антителами против Hsp70 (1 : 1000; Abcam, Великобритания), против β-актина (1 : 1000; Sana Cruz Biotechnology, США) или GAPDH (Invitrogen, США) в течение ночи при 4°C. Протокол хемилюминесценции с применением реактива Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitogen, США) был использован для визуализацим сигнала. Для оценки денситометрии использовали ImageJ (NIH, США). Уровень белка Hsp70 был нормирован на сигнал β-актина или GAPDH.

Полисомнография. Регистрацию полисомнограмм проводили в изолированной от звуковых и световых раздражителей экспериментальной камере в условиях свободного поведения животных с использованием телеметрического оборудования "Dataquest A.R.T. System" (DSI, США). Под общим наркозом (Золетил100, tiletamine hydrochloride and zolazepam, 70 мг/кг внутримышечно; Virbac Sante Animale, France) крысам контрольной (n = 5) и экспериментальной (n = 5) групп вживляли подкожно телеметрический модуль 4ET (DSI, США) для регистрации электроэнцефалограммы (ЭЭГ), электроокулограммы глазных мышц (ЭОГ), электромиограммы (ЭМГ) шейной мышцы, температуры тела. Период послеоперационной реабилитации составлял не менее 2 нед. Регистрация полисомнограмм проводилась с момента введения соединения U133 или его растворителя в течение 24 ч.

Анализ полисомнограмм выполняли в программе Sleep_Pro, разработанной в лаборатории (М.В. Гузеев). Программа отфильтровывала сигнал ЭЭГ в диапазоне 0.5–100 Гц, а сигнал ЭМГ – в диапазоне 10–100 Гц; частота дискретизации АЦП – 250 Гц. На полисомнограммах выделяли 4 состояния: бодрствование – высокий тонус мышц или двигательная активность на ЭМГ, низкоамплитудная, высокочастотная, десинхронизированная ЭЭГ, включая периоды со смешанной амплитудой и частотой; дремота – на ЭЭГ небольшие периоды умеренной медленноволновой активности, наблюдаются сонные веретена, ЭМГ демонстрирует тонус мышц ниже, чем в бодрствовании; МВС – высокоамплитудная ЭЭГ с преобладанием медленноволновой активности (0.8–4 Гц), низкий тонус мышц на ЭМГ; парадоксальный сон (ПС) – на ЭЭГ коры головного мозга преобладает десинхронизация или тета-ритм (5–8 Гц), на ЭМГ отсутствие мышечного тонуса, прерываемого периодическими мышечными подергиваниями, быстрые движения глаз на ЭОГ. Эпоха анализа бодрствования и МВС составляла 10 с, при идентификации дремоты и ПС использовали эпоху менее 10 с. Для оценки архитектуры сна анализировали общее время, среднею длительность и число эпизодов состояний бодрствования, дремоты, МВС и ПС.

Для оценки интенсивности (качества) МВС определяли медленноволновую активность ЭЭГ в дельта диапазоне в состоянии МВС как отношение спектральной плотности в полосе частот 0.7–4 Гц за каждый час регистрации к среднесуточной спектральной плотности диапазона 0.7–50 Гц. Представленность глубокого МВС рассчитывали как продолжительность сна с преобладанием медленноволновой активности от общего времени МВС.

Тест Y-образный лабиринт использовался для оценки пространственной рабочей памяти крыс [28]. Установка представляла собой лабиринт с тремя равнозначными рукавами 50 × 16 × 31 см. Исследование выполнено на 12 крысах, равномерно разделенных на две независимые группы. Тестирование начинали через 24 ч после введения соединения U133 или растворителя в начале светлой фазы суток. Крыса, помещенная в Y-образный лабиринт, обследовала новое пространство, поочередно посещая различные рукава. Регистрировалось количество и последовательность заходов крысы в рукава лабиринта за 10 мин теста, где выделяли правильные триады, выражающиеся в чередовании трех разных рукавов. В финальном расчете в качестве показателя рабочей памяти высчитывался коэффициент спонтанного чередования по следующей формуле: $\frac{\text{число правильных триад}}{\text{общее число входов в рукава} - 2} \times 100\%$. Низкий процент чередования свидетельствовал о нарушении пространственной рабочей памяти, поскольку крыса не может вспомнить, какой рукав она только что посетила, и, таким образом, демонстрирует снижение спонтанного чередования.

Статистика. Статистический анализ результатов выполнен в программе Prism – GraphPad 8. Нормальность распределения проверяли с помощью теста Колмогорова–Смиронова. Статистическую обработку данных по Вестерн-блотам выполняли

с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим Sidak's post-hoc test. Для выявления различий во временных характеристиках цикла бодрствование-сон и показателях пространственной памяти использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента. Полученные различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Системное введение U133 приводит к повышению содержания индуцибельного белка Hsp70 в головном мозге

На первом этапе работы необходимо было оценить Hsp-70-индуцирующую активность соединения U133 в структурах головного мозга, вовлеченных в регуляцию сна и когнитивных функций (кчЧС/ВТО, голубое пятно, преоптическая область гипоталамуса) [29–33]. Содержание Hsp70 было изучено через 12 и 24 ч после в/б введения U133. Однофакторный анализ ANOVA показал статистически значимые различия в группе с введением U133 по сравнению с контрольной группой (введение растворителя): кчЧС/ВТО ($F (2, 11) = 5.7$; $p = 0.02$), голубое пятно ($F (2, 10) = 14.9$; $p = 0.001$), преоптическая область гипоталамуса ($F (2, 3) = 13.1$; $p = 0.03$). Используя Sidak's post-hoc test, мы показали, что системное введение соединения U133 вызывает значимое повышение уровня Hsp70 во всех изучаемых структурах (рис. 1*a*–*c*). При этом повышенный уровень Hsp70 сохранялся через 24 ч после введения индуктора, но дальнейшего прироста Hsp70 не отмечалось.

Индуктор шаперонов U133 увеличивает представленность парадоксального сна

Повышение уровня Hsp70 в кчЧС/ВТО, голубом пятне, преоптической области гипоталамуса при введении соединения U133 совпадало по срокам с изменениями временных характеристик ПС (REMS). Общее время ПС начинало возрастать через 12 ч после введения U133 и сохранялось на повышенном уровне в течение последующих 12 ч активной (темной) фазы суток. В среднем прирост ПС составил 73% или 31 мин (*t* тест = 3.243, $p = 0.0118$; рис. 2*a*) по сравнению с контролем.

Увеличение представленности ПС было связано с увеличением как числа эпизодов ПС (на 37%), так и их длительности (на 24%) (табл. 1). Проведенный анализ временных характеристик МВС (SWS) не выявил значимых изменений при введении соединения U133 (рис. 2*b*, табл. 1). Отмечалась лишь тенденция к возрастанию общего времени МВС (31.7 ± 1.9% в экспериментальной группе против 28.7 ± 2.3% в контрольной группе (*t* тест = 1.0, $p = 0.3$). Индуктор шаперонов не оказывал влияние на общее время бодрствования (*t* тест = 1.3, $p = 0.2$), дремоты (*t* тест = 0.3, $p = 0.8$) и представленность глубокого дельта МВС (t тест = 0.3, $p = 0.8$) (рис. 2*c*–*e*); средняя длительность и число эпизодов бодрствования и дремоты также значимо не менялись (табл. 1).

Соединение U133 не влияет на пространственную память

В многочисленных клинических и экспериментальных исследованиях продемонстрирована тесная взаимосвязь между потерей/нарушением сна и когнитивным дефицитом [34, 35]. Среди физических последствий недосыпания, пожалуй, наиболее важными являются дефицит внимания и кратковременной (рабочей) памяти. Считается, что недостаток ПС сказывается на формировании и закреплении долговременной процедурной памяти и эмоционального компонента декларативной памяти. Это позволило нам предположить, что изменение архитектуры сна за счет увеличения представленности ПС после введения U133 могло оказать влияние на когнитивные показатели в естественных физиологических условиях. Однако

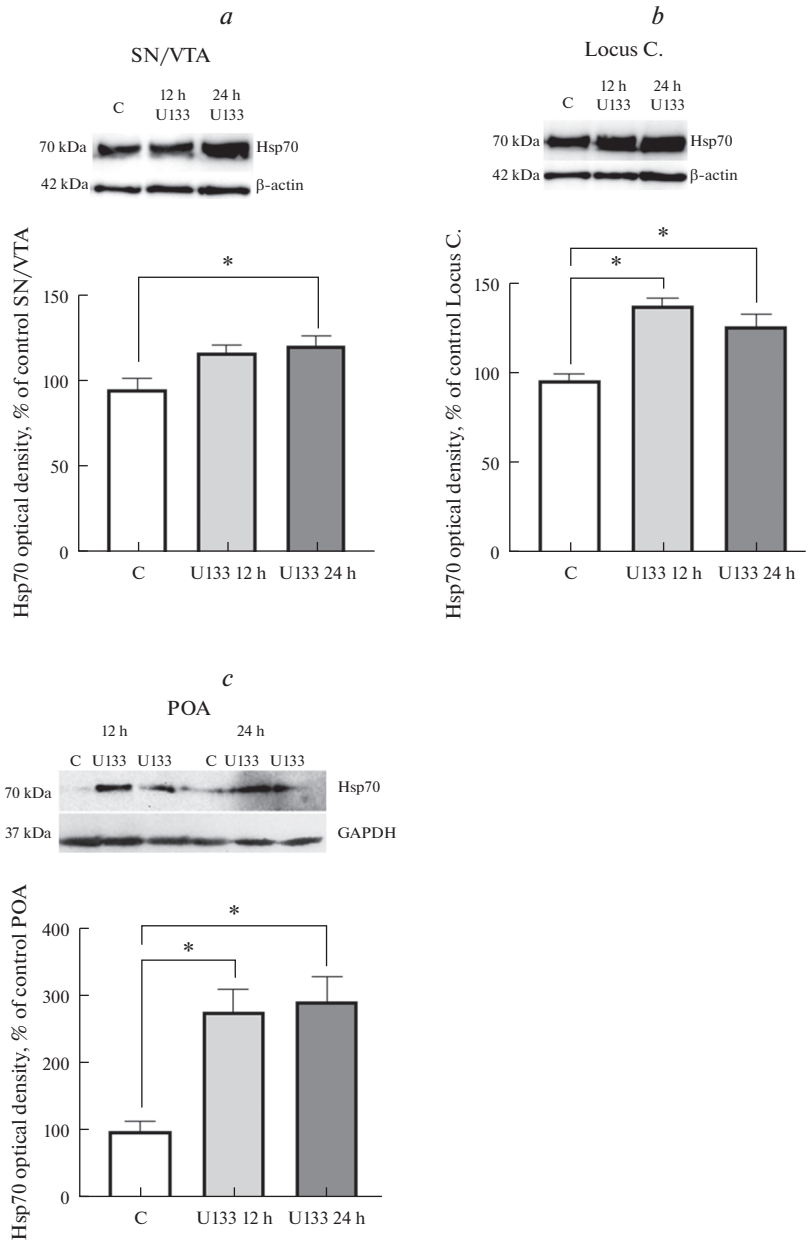


Рис. 1. Изменение содержания индуцибельного белка теплового шока Hsp70 в ткани компактной части черной субстанции/вентральной тегментальной области среднего мозга/черной субстанции (*a*), голубом пятне (*b*), преоптической области гипоталамуса (*c*) у крыс через 12 и 24 ч после внутрибрюшинного введения соединения U133.

В верхней части рисунка представлены репрезентативные иммуноблоты компактной части черной субстанции/вентральной тегментальной области (SN/VTA), голубого пятна (Locus C.), преоптической области гипоталамуса (POA). На графике по вертикали — оптическая плотность Hsp70, % от контроля. Проведен дисперсионный анализ ANOVA с последующим post-hoc анализом с помощью критерия Сидак HSD. Достоверность различий в опыте относительно контроля * – $p < 0.05$.

Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего.

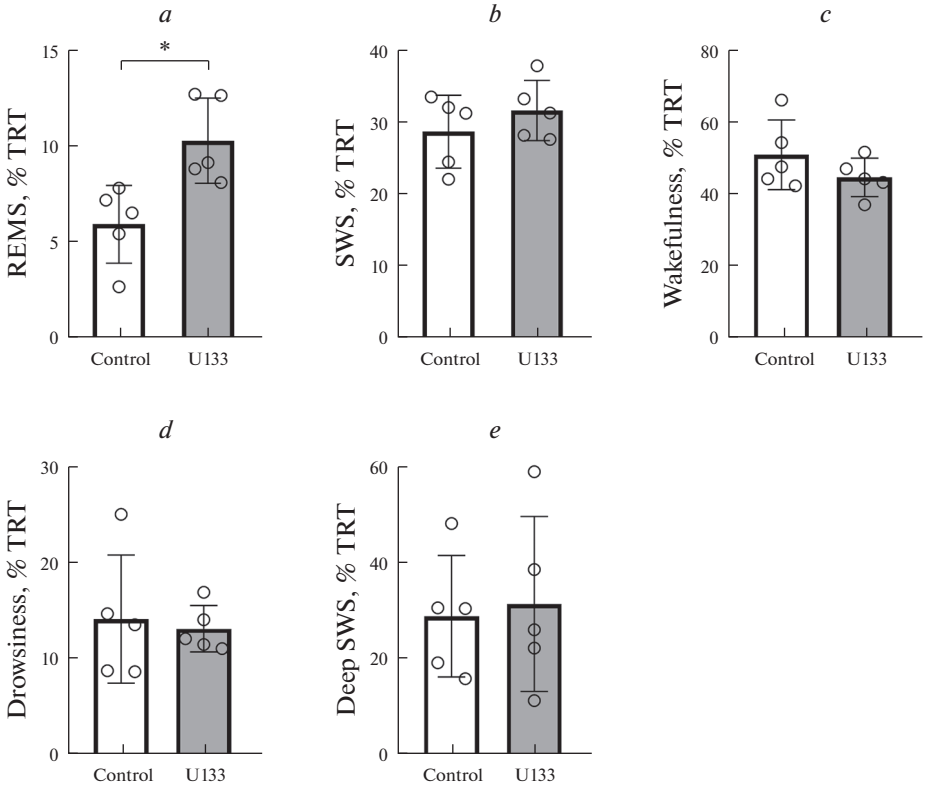


Рис. 2. Изменение общего времени состояний бодрствования и сна за 12 ч активной фазы суток при системном введении индуктора шаперонов U133 у крыс.
По вертикали – процент времени состояния за 12 ч. * – достоверные изменения по сравнению с контролем ($p < 0.05$, t-критерий Стьюдента). REMS – парадоксальный сон, SWS – медленноволновый сон. Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего.

Таблица 1. Средняя длительность и число эпизодов состояний бодрствования и сна в активную фазу суток при введении соединения U133 у крыс

	Группа	Средняя длительность эпизодов	Число эпизодов
Бодрствование	Контроль	267.3 ± 48.6	89 ± 11.1
	U133	253.2 ± 21.6	76.6 ± 5.4
Дремота	Контроль	36.9 ± 4.2	162.2 ± 21.2
	U133	33.9 ± 1.7	165.4 ± 11.1
ПС	Контроль	107.8 ± 5.5	23.6 ± 3.3
	U133	**134 ± 9.8 ***	**32.4 ± 1.2 ***
МВС	Контроль	118.6 ± 19.1	113.4 ± 17.3
	U133	112.6 ± 12.1	122 ± 7.5

МВС – медленноволновый сон; ПС – парадоксальный сон. * – достоверные отличия от контроля ($p < 0.05$, t-критерий Стьюдента).
Данные представлены в виде среднего значения за 12 ч активной фазы суток ± ошибка среднего ($n = 5$).

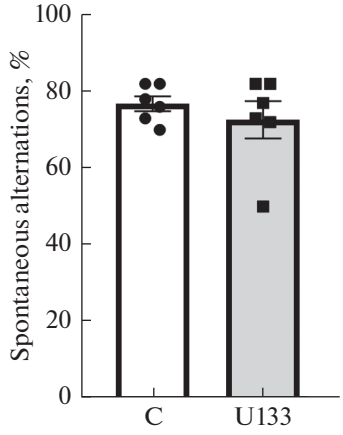


Рис. 3. Оценка пространственной рабочей памяти в тесте Y-образный лабиринт у крыс после введения соединения U133. По вертикали: доля правильных спонтанных чередований (коэффициент). По горизонтали: использованные группы животных. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. С – контроль.

при оценке пространственной рабочей памяти в тесте Y-образный лабиринт у крыс не было обнаружено достоверных различий в коэффициенте спонтанных чередований между контрольной группой и группой с введением U133 (*t*-тест, $p > 0.05$; рис. 3). Не наблюдалось также значимых различий между указанными группами и в показателе двигательной активности, о чем судили по количеству заходов в рукава лабиринта (15.4 ± 1.4 в экспериментальной группе против 13.8 ± 2.0 в контрольной).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование показало, что системное введение соединения U133 крысам среднего возраста в естественных физиологических условиях приводит через 12 ч с момента введения к значимому возрастанию уровня Hsp70 в голубом пятне, преоптической области гипоталамуса, кчЧС/ВТО, которые включены в нервные сети регуляции цикла бодрствование–сон и процессы формирования памяти [29–33]. При этом повышенный уровень шаперона Hsp70 сохранялся в течение последующих 12 ч, что указывает на длительный процесс транскрипции и трансляции шаперона Hsp70. Ранее нами показано, что Hsp70-индуцирующая активность соединения U133 связана с его способностью активировать белковый фактор транскрипции HSF1, что приводит к ядерной транслокации HSF1 и связыванию с регуляторным элементом теплового шока (HSE) с последующей активацией промотора *hsp70*; после этого начинается транскрипция и синтез Hsp70 [12]. Важно отметить, что потенциал U133 для активации HSF1 был сопоставим с тепловым шоком, что свидетельствует о высоком уровне индуцирующего действия хиноидного соединения на транскрипцию гена *hsp70*.

Повышение уровня Hsp70 в структурах головного мозга при введении соединения U133 было сопряжено с увеличением в 1.7 раза продолжительности ПС вследствие активации как механизмов генерации (увеличение числа эпизодов), так и поддержания этого состояния (возрастание длительности эпизодов ПС). Эти факты позволяют полагать, что механизм действия соединения U133 на ПС связан с повышенной экспрессией шаперона Hsp70 в структурах головного мозга, вовлеченных в регуляцию ПС (преоптическая область гипоталамуса, кчЧС/ВТО).

В пользу этого свидетельствуют данные об уменьшении общего времени МВС и ПС в условиях подавления синтеза Hsp70 и снижения его уровня на 60% в вентролатеральной преоптической области гипоталамуса крыс, где локализуется один из основных "центров" регуляции сна [19]. Дополнительным подтверждением вовлечения шаперона Hsp70 в клеточно-молекулярные механизмы модуляции ПС и интеграцию двух состояний сна (МВС и ПС) в суточном цикле явились данные о возрастании уровня экспрессии гена *Hspa1* в стволе головного мозга в условиях естественной повышенной представленности ПС [36]. Кроме того, ПС-индуцирующий эффект соединения U133 может быть опосредован модулирующим влиянием шаперона Hsp70 на нейромедиаторные процессы и внутриклеточные сигнальные каскады. Ранее показано, что экзогенный Hsp70 может модулировать МВС через ГАМК- и аденозин-связанные механизмы в преоптической области гипоталамуса [18, 37]. Модулирующая функция Hsp70 может осуществляться посредством взаимодействия шаперона с синаптическими белками и синтезирующими системами нейромедиаторов, в частности с GAD67, ферментом синтеза ГАМК [38]. При обсуждении механизмов действия U133 на ПС нельзя исключить и вклад других генов транскрипционной сети, которую HSF1 координирует. Среди них гены ко-шаперона *hsp40* и подмножество генов, кодирующих SNARE и SNARE-ассоциированные белки (*Vamp2*, *Syt1* и *Snap25*), и ген, кодирующий субъединицу α4 рецептора $ГАМК_A$, что может оказать влияние на высвобождение нейротрансмиттеров и привести к синаптической модификации ГАМК сигнала в структурах головного мозга, вовлеченных в механизмы регуляции ПС [39–42].

Несмотря на выраженное влияние соединения U133 на показатели ПС, явных изменений в архитектуре МВС нами не выявлено, что отличает действие индуктора шаперонов от сомногенных эффектов экзогенного белка Hsp70 (увеличение представленности МВС и уменьшение времени ПС), наблюдаемых при его введении в 3-й желудочек мозга [43]. Расхождение эффектов может быть обусловлено разницей в механизмах действия экзогенного и эндогенного Hsp70 или U133 индуцированной транскрипционной активностью фактора теплового шока HSF1.

Несмотря на то, что ПС влияет на память различной модальности [34, 35], нам не удалось выявить эффекта индуктора шаперонов U133 на пространственную рабочую память крыс в естественных физиологических условиях. В большинстве работ [22, 23, 44] описанные позитивные эффекты Hsp70 затрагивали в большей мере механизмы консолидации памяти, то есть упрочения уже сформированного следа памяти, или процесса перехода кратковременной памяти в долговременную. В тесте спонтанных чередований в Y-образном лабиринте для выполнения задачи животные задействовали в своем поведенческом репертуаре рабочую память, где требовалось на очень короткий период времени (как правило, не более минуты) сформировать энграмму, и при последующей смене события (рукава лабиринта) "стереть" ее и заменить новой. Иными словами, в основе памяти, оцениваемой в нашем тесте, по сравнению с представленными выше работами лежали принципиально другие нейрофизиологические механизмы, в которых не обнаруживается участие исследуемого соединения U133. С другой стороны, отсутствие эффекта на память может еще объяснятся и тем, что в дизайне нашего эксперимента отсутствовали какие-либо патологические нарушения памяти у животных, требующие коррекции или восстановления с помощью U133. Очевидным является то, что обнаружить какие-либо улучшения памяти в нормальных физиологических условиях с помощью фармакологических манипуляций значительно сложнее, чем при патологии. Исходя из этого, можно полагать, что соединение U133 может оказаться эффективным средством для коррекции нарушений памяти при различных видах неврологических патологий (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, инсульт и др.), что по своей природе является оптимальным условием для проявления за-

щитных свойств Hsp70-индуцирующей активности соединения U133. В качестве примера стоит привести данные о корректирующем влиянии фармакотерапии с индуктором Hsp70 куркумином на показатели рабочей и референтной памяти (в тестах Y-образный лабиринт и лабиринт Морриса соответственно) в модели болезни Альцгеймера у крыс [25]. При этом авторы не выявили влияние одноразового введения препарата на референтную память в нормальных физиологических условиях. Эти данные сходны с результатом нашего эксперимента, проводимого по протоколу острого опыта, тем самым представляют еще один аргумент для объяснения отсутствия эффекта.

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что индуктор шаперонов U133 влияет на архитектуру сна, увеличивая количество ПС, и не оказывает влияния на пространственную рабочую память у крыс в естественных физиологических условиях. При этом ПС-индуцирующий эффект соединения U133 был сопряжен с повышением содержания шаперона Hsp70 в структурах головного мозга, участвующих в регуляции сна. Это свидетельствует о том, что действие соединения U133 на ПС опосредуется через повышение экспрессии шаперонов в головном мозге.

Соединение U133 может быть рекомендовано для дальнейшего исследования спектра биологической активности с целью прогнозирования его терапевтической эффективности при различных патологиях ЦНС и старении, когда нарушается сон и уменьшается экспрессия шаперонов в головном мозге.

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № АААА-А18-118012290427-7).

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и методология работы (И.В.Е.), проведение экспериментов на животных (Н.С.К, М.Б.П., М.В.Ч.), синтез соединения U133 (С.Г.П.), анализ данных (Н.С.К, М.Б.П., М.В.Ч., Ю.Ф.П., И.В.Е.,), подготовка чернового варианта рукописи (Н.С.К, М.Б.П., М.В.Ч.), написание и редактирование рукописи (И.В.Е., Ю.Ф.П.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи выражают благодарность м.н.с. ИЭФБ РАН М.А. Гузееву за методическую помощь в проведении полисомнографических экспериментов. Полисомнографические и биохимические исследования проводились в Центре коллективного пользования ИЭФБ РАН.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mostert S, Petzer A, Petzer JP* (2016) Evaluation of natural and ynthetic 1,4-naphthoquinones as inhibitors of monoamine oxidase. Chem Biol Drug Des 87: 737–746. https://doi.org/10.1111/cbdd.12708
2. *Aminin D, Polonik S* (2020) 1,4-Naphthoquinones: some biological properties and application. Chem Pharm Bull 68: 46–57. https://doi.org/10.1248/cpb.c19-00911
3. *Sabutski YE, Menchinskaya ES, Shevchenko LS, Chingizova EA, Chingizov AR, Popov RS, Denisenko VA, Mikhailov V V., Aminin DL, Polonik SG* (2020) Synthesis and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of oxathiine-fused quinone-thioglucoside conjugates of substituted 1,4-Naphthoquinones. Molecules 25: 3577. https://doi.org/10.3390/molecules25163577
4. *Menchinskaya E, Chingizova E, Pislyagin E, Likhatskaya G, Sabutski Y, Pelageev D, Polonik S, Aminin D* (2021) Neuroprotective effect of 1,4-Naphthoquinones in an in vitro model of paraquat and 6-OHDA-induced neurotoxicity. Int J Mol Sci 22: 9933. https://doi.org/10.3390/ijms22189933
5. *Мищенко НП, Федореев СА* (2003) Новый оригинальный отечественный препарат гистохром®. Хим-фармацевт журн 37: 49–53 [*Mishchenko NP, Fedoreev SA* (2003) Novyj original'nyj otechestvennyj preparat gistohrom ® . Him-farmacevt zhurn 37: 49–53. (In Russ)].

6. *Егоров ГБ, Алехина ВА* (1999) Новый биоантиоксидант гистохром в клинике глазных болезней. Вестн офтальмологии 115: 34–35 [*Egorov GB, Alyokhina* (1999) A new bioantioxidant histochrome in the clinic of eye diseases. Bulletin of Ophthalmology 115: 34–35. (In Russ)].
7. *Сакирова АН, Иванова МВ* (1997) Фармакокинетика и клиническая эффективность гистохрома у больных острым инфарктом миокарда. Эксперим и клин фармакол 60: 21–24 [*Sakirova AN, Ivanova MV* (1997) Pharmacokinetics and clinical efficacy of histochrome in patients with acute myocardial infarction. Experim and klin pharmacol 60: 21–24. (In Russ)].
8. *Лебедев АВ, Левицкая ЕЛ* (2001) Антиоксидантные свойства, автоокисление и мутагенная активность ухинохрома А в сравнении с его устерифицированным аналогом. БИОХИМИЯ 66: 1089–1098 [*Lebedev AV, Levitskaya EL* (2001) Antioxidant properties, autooxidation and mutagenic activity of ukhinochrome A in comparison with its esterified analog. BIOCHEMISTRY 66: 1089–1098. (In Russ)].
9. *Lebedev A V, Ivanova M V, Levitsky DO* (2005) Echinochrome, a naturally occurring iron chelator and free radical scavenger in artificial and natural membrane systems. Life Sci 76: 863–875. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.007
10. *Yurchenko AE* (2015) Hsp70 induction and anticancer activity of U-133, the acetylated trisglucosydic derivative of echinochrome. Med Chem (Los Angeles) 5: 263–271. https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000274
11. *Lazarev VF, Nikotina AD, Mikhaylova ER, Nudler E, Polonik SG, Guzhova I V, Margulis BA* (2016) Hsp70 chaperone rescues C6 rat glioblastoma cells from oxidative stress by sequestration of aggregating GAPDH. Biochem Biophys Res Commun 470: 766–771. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.076
12. *Ekimova IV, Plaksina DV., Pastukhov YF, Lapshina KV, Lazarev VF, Mikhaylova ER, Polonik SG, Pani B, Margulis BA, Guzhova IV., Nudler E* (2018) New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease. Exp Neurol 306: 199–208. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.012
13. *Guzhova IV, Lazarev VF, Kaznacheeva AV, Ippolitova MV, Muronetz VI, Kinev AV, Margulis BA* (2011) Novel mechanism of Hsp70 chaperone-mediated prevention of polyglutamine aggregates in a cellular model of huntington disease. Hum Mol Genet 20: 3953–3963. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr314
14. *Belan DV, Polonik SG, Ekimova IV* (2021) Assessment of the efficacy of preventive therapy with chaperone inducer U133 in a model of the preclinical stage of Parkinson's disease in elderly rats. Neurosci Behav Physiol 51: 673–680. https://doi.org/10.1007/s11055-021-01120-3
15. *Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU* (2018) Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. J Cell Biol 217: 51–63. https://doi.org/10.1083/jcb.201709072
16. *Пастухов ЮФ, Худик КА, Екимова ИВ* (2010) Шапероны в регуляции и восстановлении физиологических функций. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 96(7): 708-25 [*Pastukhov IuF, Khudik KA, Ekimova IV* (2010) Chaperones in regulation and restoration of physiological functions. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 96(7): 708–725. (In Russ)].
17. *Zatsepina OG, Evgen'ev MB, Garbuz DG* (2021) Role of a heat shock transcription factor and the major heat shock protein Hsp70 in memory formation and neuroprotection. Cells 10: 1638. https://doi.org/10.3390/cells10071638
18. *Ekimova IV* (2013) Somnogenic effect of exogenous heat shock protein 70 kDa is mediated by GABA(A) receptors in the preoptic area of the hypothalamus. Dokl Biol Sci 449: 89–92. https://doi.org/10.1134/S0012496613020130
19. *Pastukhov IF, Simonova VV, Guzeev MA, Meshalkina DA, Guzhova IV, Ekimova IV* (2015) Chaperone Hsp70 is involved in the molecular mechanisms of slow wave sleep regulation. Dokl Biochem Biophys 461: 76–79. https://doi.org/10.1134/S1607672915020040
20. *Pastukhov YF, Simonova VV, Shemyakova TS, Guzeev MA, Polonik SG, Ekimova IV* (2020) U-133, a chaperone inducer, eliminates sleep disturbances in a model of the preclinical stage of Parkinson's disease in aged rats. Adv Gerontol 10: 254–259. https://doi.org/10.1134/S2079057020030133
21. *Ekimova IV, Pazi MB, Belan DV, Polonik SG, Pastukhov YF* (2021) The chaperone inducer U133 eliminates anhedonia and prevents neurodegeneration in monoaminergic emotiogenic brain structures in a preclinical model of Parkinson's disease in aged rats. J Evol Biochem Physiol 57: 1130–1141. https://doi.org/10.1134/S0022093021050148
22. *Porto RR, Dutra FD, Crestani AP, Holsinger RMD, Quillfeldt JA, Homem de Bittencourt PI, de Oliveira Alvares L* (2018) HSP70 facilitates memory consolidation of fear conditioning through MAPK pathway in the hippocampus. Neuroscience 375: 108–118. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.028

23. *Hooper PL, Durham HD, Török Z, Hooper PL, Crul T, Vígh L* (2016) The central role of heat shock factor 1 in synaptic fidelity and memory consolidation. Cell Stress Chaperones 21: 745–753. https://doi.org/10.1007/s12192-016-0709-1
24. *Teiten M-H, Reuter S, Schmucker S, Dicato M, Diederich M* (2009) Induction of heat shock response by curcumin in human leukemia cells. Cancer Lett 279: 145–154. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.031
25. *Zhang L, Fang Y, Xu Y, Lian Y, Xie N, Wu T, Zhang H, Sun L, Zhang R, Wang Z* (2015) Curcumin improves amyloid β-peptide (1–42) Induced spatial memory deficits through BDNF-ERK signaling pathway. PLoS One 10: e0131525. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131525
26. *Полоник С, Толкач А, Уварова Н* (1994) Гликозилирование эхинохрома и родственных гидроксинафтазаринов ортоэфирным методом. Журн. орган. химии. 30(2): 248–253. [*Polonik S, Tolkach A, Uvarova N* (2004) Glycosylation of echinochrome and related hydroxynaphthazarines by the orthoester method. Zhurn. organ. himii. 30(2): 248–253. (In Russ)].
27. *Mishchenko NP, Fedoreev SA, Bagirova VL* (2003) Histochrome: a new original domestic drug. Pharm Chem J 37: 48–52. https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1023659331010
28. *Hidaka N, Suemaru K, Takechi K, Li B, Araki H* (2011) Inhibitory effects of valproate on impairment of Y-maze alternation behavior induced by repeated electroconvulsive seizures and c-Fos protein levels in rat brains. Acta Med Okayama 65: 269–277. https://doi.org/10.18926/AMO/46853
29. *Rothhaas R, Chung S* (2021) Role of the preoptic area in sleep and thermoregulation. Front Neurosci 15: 664781. https://doi.org/10.3389/fnins.2021.664781
30. *Van Egroo M, Koshmanova E, Vandewalle G, Jacobs HIL* (2022) Importance of the locus coeruleus-norepinephrine system in sleep-wake regulation: Implications for aging and Alzheimer's disease. Sleep Med Rev 62: 101592. https://doi.org/10.1016/j.smrv.2022.101592
31. *Oishi Y, Lazarus M* (2017) The control of sleep and wakefulness by mesolimbic dopamine systems. Neurosci Res 118: 66–73. https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.04.008
32. *Mather M, Harley CW* (2016) The locus coeruleus: essential for maintaining cognitive function and the aging brain. Trends Cogn Sci 20: 214–226. https://doi.org/10.1016/j.tics.2016.01.001
33. *D'Ardenne K, Eshel N, Luka J, Lenartowicz A, Nystrom LE, Cohen JD* (2012) Role of prefrontal cortex and the midbrain dopamine system in working memory updating. Proc Natl Acad Sci 109: 19900–19909. https://doi.org/10.1073/pnas.1116727109
34. *McCoy JG, Strecker RE* (2011). The cognitive cost of sleep lost. Neurobiology of learning and memory 6(4): 564–582. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.07.004
35. *Krause AJ, Simon EB, Mander BA, Greer SM, Saletin JM, Goldstein-Piekarski AN, Walker MP* (2017) The sleep-deprived human brain. Nat Rev Neurosci. 18(7): 404–418. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.55
36. *Simonova VV, Guzeev MA, Ekimova IV, Pastukhov YF* (2022) Chaperone Hsp70 (HSPA1) is involved in the molecular mechanisms of sleep cycle integration. Int J Mol Sci 23: 4464. https://doi.org/10.3390/ijms23084464
37. *Ekimova IV, Pastukhov YF* (2014) The role of adenosine A2A receptors of the preoptic area in somnogenic activity of 70 kDa protein in pigeons. J Evol Biochem Physiol 50: 492–499. https://doi.org/10.1134/S0022093014060039
38. *Ekimova IV, Nitsinskaya LE, Romanova IV, Pastukhov YF, Margulis BA, Guzhova IV* (2010) Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures. J Neurochem 115: 1035–1044. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06989.x
39. *Mendillo ML, Santagata S, Koeva M, Bell GW, Hu R, Tamimi RM, Fraenkel E, Ince TA, Whitesell L, Lindquist S* (2012) HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. Cell 150: 549–562. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.031
40. *Varodayan FP, Pignataro L, Harrison NL* (2011) Alcohol induces synaptotagmin 1 expression in neurons via activation of heat shock factor 1. Neuroscience 193: 63–71. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.035
41. *Varodayan F* (2013) HSF1 transcriptional activity mediates alcohol induction of Vamp2 expression and GABA release. Front Integr Neurosci 7: 89. https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00089

42. *Pignataro L, Miller AN, Ma L, Midha S, Protiva P, Herrera DG, Harrison NL* (2007) Alcohol regulates gene expression in neurons via activation of heat shock factor 1. J Neurosci 27: 12957–12966. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4142-07.2007
43. *Pastukhov YF, Ekimova IV, Khudik KA, Guzhova IV* (2008) Protein 70 kDa in the control of sleep and thermoregulation. J Evol Biochem Physiol 44: 74–81. https://doi.org/10.1134/S002209300801009X
44. *Beck CD, Rankin CH* (1995) Heat shock disrupts long-term memory consolidation in Caenorhabditis elegans. Learn Mem 2: 161–177. https://doi.org/10.1101/lm.2.3-4.161

Study of the Effects of the Chaperone Inducer U133 on the Temporal Characteristics of the Wake–Sleep Cycle and Spatial Memory

I. V. Ekimova[a], *, N. S. Kurmazov[a], M. B. Pazi[a], M. V. Chernyshev[a], S. G. Polonik[b], and Yu. F. Pastukhov[a]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, Saint Petersburg, Russia*
[b] *G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of Far East Branch, RAS, Vladivostok, Russia*
**e-mail: irina-ekimova@mail.ru*

The chaperone inducer U133, synthesized on the basis of echinochrome A, exhibits antitumor, antioxidant and neuroprotective activity. The breadth of therapeutic action causes great interest in this compound, since potential drugs can be developed on its basis in the future. However, to date, the spectrum of biological activity of U133 compound at the functional level has not been fully determined. The aim of the present study was to find out whether the increase in the content of the Hsp70 chaperone in the brain, achieved with the help of the compound U133, is associated with a change in the wake-sleep cycle and spatial working memory in Wistar rats under natural physiological conditions. The study showed that intraperitoneal administration of U133 leads to an increase in the content of chaperone Hsp70 (HSPA1) in brain structures involved in the mechanisms of sleep-wakefulness cycle regulation and memory formation (the locus coeruleus, preoptic region of the hypothalamus, substantia nigra, ventral tegmental area of the midbrain). An increase in the level of Hsp70 in the brain was associated with a 1.7-fold increase in the duration of rapid-eye movement sleep (REMS) in the period from the 12th to the 24th hour after the administration of the chaperone inductor. This data suggest that the resulting effect of the compound U133 on the REMS representation is implemented with the participation of the chaperone Hsp70. Despite the fact that REMS can influence the formation of different types of memory, we did not find a significant effect of U133 on spatial working memory. Compound U133 can be recommended for further investigation of the spectrum of biological activity in order to predict its therapeutic effectiveness in various pathologies of the central nervous system and aging, when sleep is disturbed and the chaperone expression in the brain decreases.

Keywords: chaperone inducer U133, Hsp70, brain, rapid-eye movement sleep, spatial working memory, rats

EDN: CFHFSE
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 8, с. 997–1014

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В СТРУКТУРНОЙ И УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПИРИФОРМНОЙ КОРЫ У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ 5XFAD

© 2022 г. Н. Л. Туманова[1], Д. С. Васильев[1, *], Н. М. Дубровская[1], Н. Н. Наливаева[1]

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

**E-mail: dvasilyev@bk.ru*

Поступила в редакцию 17.06.2022 г.
После доработки 20.07.2022 г.
Принята к публикации 20.07.2022 г.

Анализ патологических изменений структурно-функциональной организации пириформной коры у мышей линии 5xFAD, моделирующих патогенез болезни Альцгеймера, показал, что в возрасте 7 мес. в ней имеет место повышенная агрегация β-амилоидного пептида, гибель нейронов, распад миелиновых оболочек нервных волокон, агглютинация синаптических пузырьков в синаптических окончаниях и появление большого количества аутофаголизосом в телах и отростках нейронов. Также в пириформной коре таких животных обнаружены очаги глиоза и почти трехкратное повышение содержания глиального маркерного белка GFAP по сравнению с животными дикого типа. Все эти нарушения имели более выраженный характер по сравнению с исследованной нами ранее энторинальной корой 5xFAD мышей. Между пириформной и энторинальной областями также выявлено различие в распределении амилоид-деградирующей металлопептидазы неприлизина (НЕП). В пириформной коре этот фермент содержится, в основном, в межклеточном пространстве, а в энторинальной коре – в телах клеток, при этом у 5xFAD мышей число НЕП-позитивных клеток на 60% ниже, чем у мышей дикого типа. У 5xFAD мышей также наблюдалось значительное ухудшение обонятельной функции, которое выражалось почти в двукратном снижении результативности поиска пищи по запаху по сравнению с мышами дикого типа. Полученные данные свидетельствуют о существенных патологических изменениях в пириформной и энторинальной коре у 5xFAD мышей, вызванных накоплением амилоида, что может являться причиной ухудшения их обоняния и сходным образом обуславливать нарушение обонятельной функции при развитии болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: электронная микроскопия, трансгенные мыши 5xFAD, обонятельные луковицы, пириформная кора, энторинальная кора, нейродегенерация, амилоидный пептид, неприлизин, обоняние

DOI: 10.31857/S086981392208009X

Трансгенные мыши линии 5xFAD являются одной из широко используемых моделей для получения информации о структурных и молекулярных изменениях в нервной ткани, а также поведенческих нарушениях, вызванных накоплением амилоидного Aβ пептида, характерным для патогенеза болезни Альцгеймера (БА) [1].

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцеймера; Aβ – β-амилоидный пептид; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок.

Нарушения метаболизма Aβ, вызванные его ускоренной продукцией и образованием амилоидных агрегатов, приводят к дегенерации и гибели нейронов, синаптопатии и нейровоспалительным процессам. От степени накопления в нервной ткани мозга мышей амилоидных агрегатов зависит уровень нарушений нейрональных функций и пластичности мозга, а также активации микроглии [2]. По литературным данным у 5xFAD мышей уже на 3-м месяце жизни одновременно с образованием амилоидных бляшек начинает развиваться астроглиоз и микроглиоз [1]. При развитии амилоидогенеза гибель нейронов у мышей линии 5xFAD наблюдается во многих отделах мозга. Так, в субикулуме и в V кортикальном слое новой коры гибель нейронов начинается примерно в 6-месячном возрасте [3]. В этом же возрасте наблюдается уменьшение количества холинэргических нейронов в базальной части переднего мозга [4]. Синаптическая дегенерация начинается в мозге в 4-месячном возрасте [5], а к 12 месяцам в гиппокампе исчезает около 50% аксошипиковых синапсов [6]. При этом наблюдаемые когнитивные нарушения коррелируют с нарушением кратковременной и долговременной памяти [7], а изменения на молекулярном уровне начинаются задолго до формирования функциональных нарушений [8].

Поскольку деструктивные изменения ткани мозга при БА связаны с ранним нарушением обоняния [9], изучение обонятельной функции при развитии амилоидоза у 5xFAD мышей представляет особый интерес. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что в процессе развития патологии у этих мышей происходит дегенерация терминальных окончаний волокон обонятельного нерва, связанных с накоплением в них Aβ [10]. Имеются также данные о нарушении у 5xFAD мышей экспрессии генов обонятельных рецепторов Olfr110/111 и Olfr544 в коре и гиппокампе [11]. Все это свидетельствует о необходимости сопоставления патологических изменений в периферической и центральной частях обонятельного анализатора при развитии амилоидогенеза у трансгенных мышей. Ранее у 5xFAD мышей нами проводилось исследование энторинальной коры и гиппокампа, входящих в состав центрального обонятельного анализатора, которое показало существенные нарушения структурной организации этих структур мозга [12]. Пириформная область коры головного мозга также является одним из центров обработки информации обонятельного анализатора млекопитающих и получает прямые проекции из обонятельных луковиц, однако данные об изменении ее структуры при развитии патогенеза у 5xFAD мышей отсутствуют, что и послужило целью данного исследования.

Накопление Aβ в ткани мозга тесно связано со снижением в нем содержания и активности амилоид-деградирующего фермента неприлизина (НЕП) [13, 14]. Как было показано в наших исследованиях, снижение экспрессии НЕП в энторинальной коре и гиппокампе, как на уровне РНК, так и на уровне белка, коррелирует с нарушением обоняния и когнитивных функций у крыс и мышей [15–17]. В нашем предыдущем исследовании было показано, что снижение экспрессии НЕП также коррелирует с накоплением амилоидных отложений и когнитивным дефицитом у 5xFAD мышей [18].

Целью данного исследования являлся сравнительный анализ структурных и ультраструктурных изменений в пириформной коре (центральный отдел) и обонятельных луковицах (периферический отдел обонятельного анализатора), содержания глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), распределения нейропептидазы НЕП, а также обонятельного поведения у трансгенных мышей линии 5xFAD и мышей дикого типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В работе использовали самцов мышей линий C57BL (C57BL/6 – дикий тип) и 5xFAD (линия трансгенных мышей Tg(APPSwFlLon, PSEN1 ×

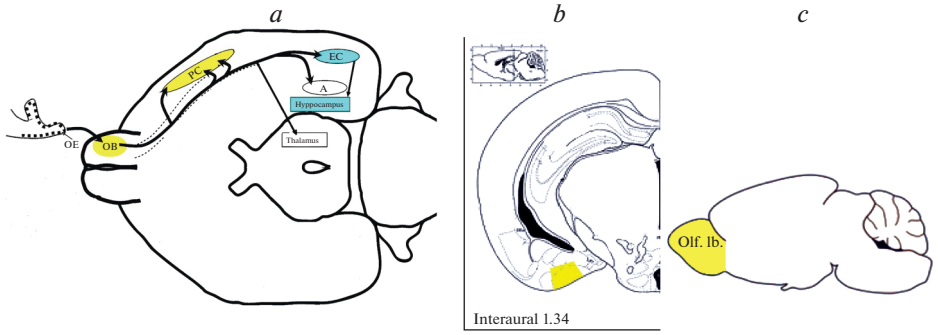


Рис. 1. (*a*) – схема основных путей передачи сигнала в отделах обонятельного анализатора мыши. Контуром показана вентральная поверхность головного мозга. Обозначения: OE – обонятельный эпителий в носовой полости, OB – обонятельная луковица, PC – пириформная кора, EC – энторинальная кора, Hippocampus – гиппокамп, Thalamus – таламические ядра, A – миндалина. Бирюзовым цветом выделены отделы мозга, изученные нами ранее [12], желтым – отделы мозга, описываемые в настоящей работе. (*b*–*c*) – схемы расположения исследуемых областей пириформной коры (*b*) и обонятельной луковицы (*c*). Области интереса выделены желтым цветом.

× M146L × L286V)6799Vas/J, поддерживаемая на генетическом фоне C57BL/6 в гемизиготном по трансгенной кассете состоянии) – модель патологии болезни Альцгеймера) в возрасте 7 месяцев из питомника “Черноголовка”, Россия. Животных содержали в стандартных условиях вивария Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН при световом режиме (12 ч день/12 ч ночь) по 4–5 особей в клетке, со свободным доступом к воде и пище. Эксперименты осуществляли согласно протоколу использования лабораторных животных Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, основанному на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными (European Communities Council Directive #86/609 for the Care of Laboratory Animals).

Световая микроскопия. Светооптическое исследование ткани мозга проводили на мышах дикого типа ($n = 8$) и линии 5xFAD ($n = 8$). Ткань мозга фиксировали методом транскардиальной перфузии 10%-ным нейтральным формалином на фосфатном буфере (PBS, 4°C, pH 7.4). Замороженные фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм изготавливали на криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия). Для исследования отбирали срезы обонятельной луковицы (4.0–2.5 мм от bregma) и пириформной коры мозга (2.0–3.0 мм от bregma в каудальном направлении) [19] (рис. 1a, b) и проводили комбинированное окрашивание по методу Ниссля и красителем Конго красным (4%-ный водный раствор). С использованием микроскопа ImagerA (Zeiss, Германия) оценивали состояние нервной ткани мозга. Количественное сравнение клеток пириформной коры проводили на серии срезов толщиной 20 мкм; первый срез серии выбирался случайно, расстояние между последующими срезами в серии составляло 40 мкм. При проведении анализа использовали программу Video Test Master-Morphology (Video Test, Санкт-Петербург, Россия). По срезам (6 на каждое животное), содержащим пириформную кору, вычисляли средние величины общего количества клеток и количества нейронов (на участке ткани площадью 10000 мкм^2) для каждого животного (C57Bl, $n = 8$; 5xFAD, $n = 8$).

Электронная микроскопия. Для анализа мозг мышей (дикий тип $n = 5$, 5xFAD $n = 4$) фиксировали методом транскардиальной перфузии смесью 1%-ного глутарового

альдегида и 1%-ного формальдегида на 0.1 М PBS, pH 7.4. Блоки, содержащие обонятельную луковицу и пириформную кору, дополнительно фиксировали 1%-ным OsO_4, контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в аралдит по стандартному протоколу [20]. На ультратоме Leica (Leica Microsystems, Германия) изготавливали срезы исследуемых структур толщиной 500Å, которые затем исследовали на электронном микроскопе FEI Tecnai V2 (FEI, США).

Иммуноблотинг. Ткань пириформной коры мышей дикого типа (n = 4) и линии 5xFAD (n = 4) гомогенизировали в 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 7.4), центрифугировали (5 мин при 2500 g и 4°C) и отбирали супернатант. Осадок ресуспендировали и контролировали отсутствие в нем белка интереса. Анализ содержания глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) проводили методом иммуноблотинга. Содержание белка в пробах определяли методом Брэдфорда. Анализируемые образцы загружали в лунки SDS-полиакриламидного геля (8%) из расчета 25 мкг белка на лунку, проводили электрофорез белков, после чего переносили их на PVDF мембрану. Мембраны блокировали 5%-ным раствором сухого молока в 0.1% Tween2/PBS и инкубировали с антителами: к GFAP (антитела ab7260 производства Abcam, разведение 1 : 1000), или к β-актину (A5060 производства Sigma, 1 : 10000). Визуализацию осуществляли с помощью HRP-конъюгированных вторичных антител против IgG кролика (Abcam, разведение 1 : 4000), используя Optiblot ECL Ultra Detect Kit (1.2pg–2ng) (Abcam, ab133409). Рассчитывали соотношение оптический плотности полосы GFAP к плотности полосы β-актина.

Иммуногистохимия. Для исследования отбирали срезы пириформной и энторинальной областей коры (рис. 1a, b) на уровне 2.0–3.3 мм от bregma [19] у животных дикого типа (n = 8) и линии 5xFAD (n = 8). Обработка материала осуществлялась как описано ранее [12]. Мозг фиксировали методом транскардиальной перфузии раствором 10%-ного нейтрального формалина на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4). На криостате Leica CM 1510S (Leica Microsystems, Германия) изготавливали фронтальные срезы мозга толщиной 15 мкм. Для снижения автофлуоресценции срезы инкубировали в 0.1 М растворе глицина (SIGMA, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4). Проводили визуальный контроль до максимального ослабления свечения в диапазоне длин волн 490–550 нм. Блокировку неспецифического связывания антител осуществляли путем инкубации в 2%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4). В блокировочный раствор добавляли 0.01% Triton X-100 для пермеабилизации клеточных мембран. Иммунохимическое мечение НЕП проводили с помощью поликлональных антител кролика Anti-CD10 (EPR5904, ab126593, Abcam, Великобритания, разведение 1 : 100), визуализацию которых осуществляли с помощью FITC-конъюгированных вторичных антител (ab96902, Abcam, Великобритания, разведение 1 : 500). В качестве негативного контроля неспецифического связывания ставили иммунохимическую реакцию в отсутствие первичных антител для каждого животного. В качестве позитивного контроля использовали ткань печени, характеризующейся высоким содержанием НЕП, взятой у мыши дикого типа. Исследование выполняли на микроскопе Leica DMR, оборудованном конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуорохрома FITC осуществляли светом He/Ar лазера при длине волны 488 нм, свечение регистрировали в диапазоне 496–537 нм. Яркость свечения FITC на поле нервной ткани площадью 10000 мкм^2 оценивали при помощи программы Video Test Master-Morphology (Video Test, Санкт-Петербург, Россия). Для каждого животного вычисляли среднее значение по 5 срезам. Нормировку полученных значений для каждого животного осуществляли путем деления свечения каждой исследуемой области пириформной или энторинальной коры на среднее значение для негативного контроля (иммунохимическая реакция в отсутствие первичных антител, среднее по 4 срезам). Сравнивали

средние нормированные значения уровня сигнала FITC для мышей дикого типа и линии 5xFAD, выраженные в % от уровня негативного контроля. В качестве дополнительного параметра для каждого среза вычисляли среднее количество НЕП-позитивных клеток (яркость свечения тел которых более чем в 3 раза превосходило яркость свечения окружающего межклеточного пространства) в случайно выбранном поле пириформной или энторинальной коры площадью 10000 мкм^2.

Тест результативности поиска пищи. В парадигме “поиск пищи” использовали модифицированную нами методику поиска корма [21]. Тестирование мышей (C57Bl, $n = 10$ и 5xFAD, $n = 7$) проводили в специальной камере площадью 100 × 100 см и непрозрачными стенками высотой 30 см. Камера обладала 16 отверстиями, равномерно распределенными в непрозрачном дне камеры. Отверстия диаметром 2 см и глубиной 4 см и нижняя поверхность камеры были заполнены деревянными опилками. Во время эксперимента в два отверстия закладывали по одному пищевому объекту с выраженным запахом (кусочки овсяного печенья диаметром 0.3 см). Кусочки корма находились под слоем опилок, ниже поверхности камеры на 0.5 см, и их расположение меняли при каждом новом тестировании животного. Перед тестированием мыши проходили 2-суточную 50%-ную пищевую депривацию. В ходе однократного ежедневного 15-минутного тестирования в течение 5 суток оценивали в баллах количество добытых кусочков корма (0, 1 или 2) и регистрировали время, затраченное на их нахождение. После нахождения второго кусочка корма тестирование прекращалось. Кроме того, за цикл тестирования подсчитывали общее число обнюхиваний всех отверстий в полу экспериментальной камеры и вычисляли индекс поисковой активности, как отношение суммарного числа обнюхиваний всех отверстий ко времени тестирования, выраженному в секундах. Полученное значение умножали на 100 и рассматривали его в качестве индекса, отражающего мотивацию поиска пищи у животных. Каждое животное в начале тестирования помещали в центр экспериментальной камеры. Перед каждым циклом тестирования поверхности камеры протирали 50%-ным раствором этилового спирта и меняли верхний слой опилок.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ SPSS SigmaStat 3.0 или GraphPad Prism 9, используя однофакторную ANOVA (one-way ANOVA) или тест Крускала–Уолиса с последующим post hoc тестом Стьюдента–Ньюмана–Кеулса для поведенческих экспериментов. При проведении морфологических экспериментов парные сравнения групп проводили с помощью *t*-теста Стьюдента или U-теста Манна–Уитни. Для анализа значений с нормальным распределением использовались методы параметрической статистики. Значимыми считались различия при $p \leq 0.05$. Все данные представлены как среднее ± ошибка среднего, кроме случаев, специально упомянутых в тесте.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологическое исследование структур мозга мышей дикого типа и мышей линии 5xFAD

Обонятельные луковицы. С помощью электронномикроскопического исследования обонятельных луковиц у трансгенных мышей линии 5xFAD в отличие от мышей дикого типа отмечены существенные изменения в строении миелинизированных волокон разных диаметров, направляющихся в пириформную кору. На рис. 2d, e видны деструктивные изменения таких волокон: сужение осевого цилиндра, расслоение миелина, образование миелиновых карманов с выпяченными ламелями. Такие признаки разрушенных миелиновых волокон не обнаружены у мышей дикого типа (рис. 2c). Деструктивным изменениям подвержены и нейроны обонятель-

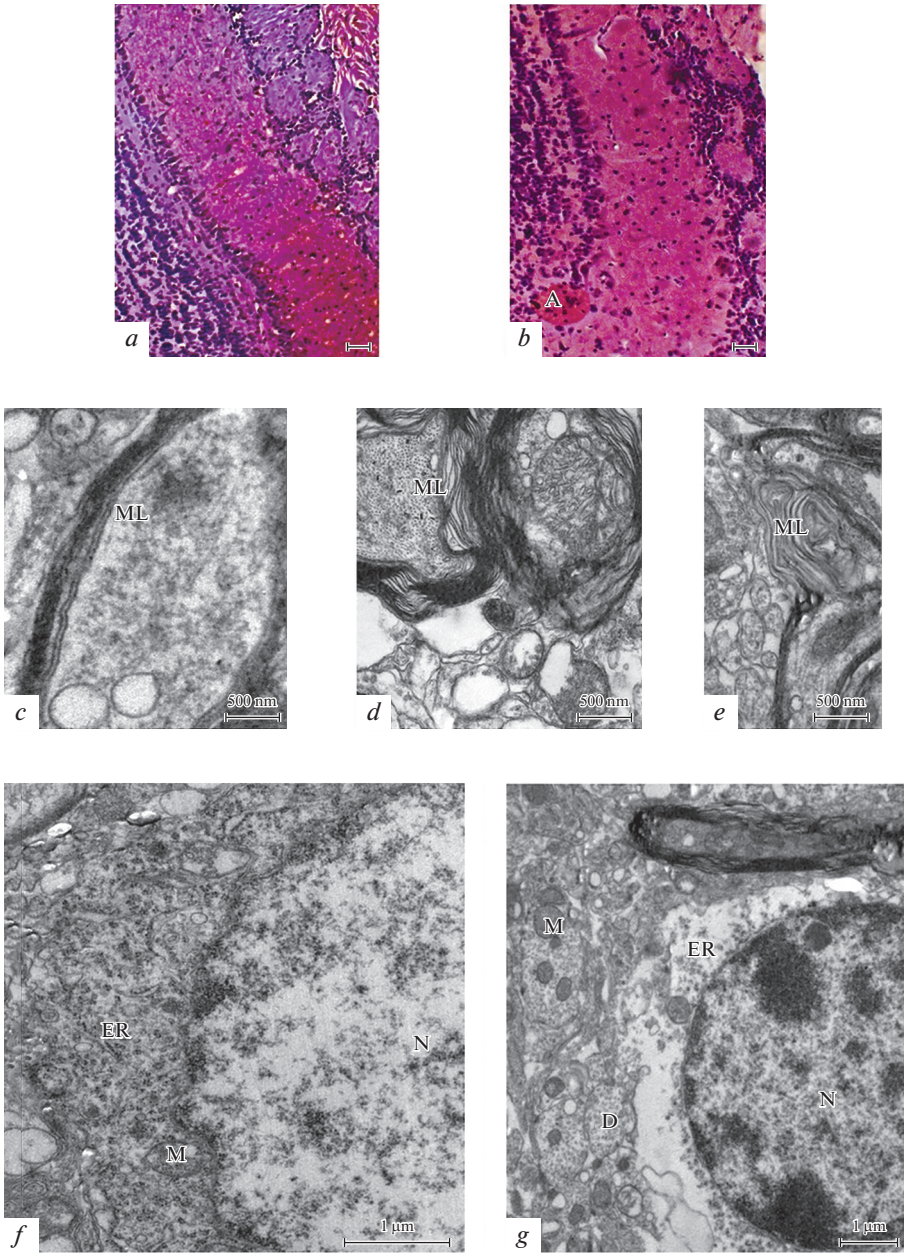


Рис. 2. Структурная организация обонятельных луковиц у мышей дикого типа (*a*, *c*, *f*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*b*, *d*, *e*, *g*) в возрасте 7 мес. (*a*) – окраска по Нисслю, *b* – двойное окрашивание по Нисслю и Конго красным. (*a*–*b*) – масштаб 60 мкм. (*c*–*g*) – электронноограммы участков нейропиля с нейронами в обонятельной луковице. Обозначение: A – амилоидные образования (бляшки), D – дендриты, N – нейроны, M – митохондрии, ER – ЭПР, ML – миелиновые волокна.

ных луковиц у трансгенных мышей, особенно в очагах поражения, где отмечены скопления амилоидных образований (бляшек) как в слое митральных клеток, так и в волокнистых слоях (рис. 2a, b). На электроннограммах обонятельных луковиц трансгенных мышей, по сравнению с мышами дикого типа, обнаружены нейроны с признаками клеточной гибели: лизисом органелл в цитоплазме и признаками дегенерации по типу хроматолиза (рис. 2f–g). В обонятельных луковицах 5xFAD мышей часто встречаются нейроны с деструкцией ядерной и цитоплазматической мембран, с разрушением митохондрий и расширенными каналами эндоплазматического ретикулума, а также появляется большое количество глиальных клеток. В нейропиле обонятельных луковиц трансгенных мышей часто встречаются аутофаголизосомы различных форм и размеров (рис. 2a).

Пириформная кора. На препаратах с двойным окрашиванием (по Нисслю и Конго красным) в пириформной коре мышей линии 5xFAD, в отличие от мышей дикого типа, обнаружено большое количество амилоидных образований (бляшек) (рис. 3a, b). У трансгенных мышей количество амилоидных образований в пириформной коре, куда поступают афферентные волокна из обонятельных луковиц, намного больше, чем в гиппокампе и энторинальной коре [12]. Причем в волокнистых областях они наблюдаются чаще, чем в клеточных. На полученных электроннограммах пириформной коры трансгенных мышей линии 5xFAD, в отличие от мышей дикого типа того же возраста, ультраструктурная организация нервных волокон, направленных из обонятельных луковиц, резко отличается, заметен распад миелиновой оболочки с разрушением ламелей, их выпячиванием, образованием миелиновых карманов и сужением осевого цилиндра (рис. 3c, e). На этой стадии развития в пириформной коре трансгенных мышей отмечаются ультраструктурные изменения нейронов и их гибель. На рис. 3f, g показаны изменения ядерной оболочки нейронов. Она становится извитой, отходит от цитоплазмы нейрона и углубляется в ядро. В цитоплазме таких нейронов происходит расширение эндоплазматического ретикулума, появление крупных вакуолей. На рис. 3g изображен нейрон с нейрофиламентозной дегенерацией. В цитоплазме нейронов пириформной коры трансгенных мышей заметны многочисленные нейрофиламенты, которые занимают большой объем клетки. В цитоплазме таких нейронов увеличено число лизосом. В нейропиле пириформной коры трансгенных мышей обнаружено большое количество синаптических терминалей с агглютинацией синаптических пузырьков, хотя синаптические контакты сохранены (рис. 3h). Такие изменения могут приводить к нарушению выделения медиатора в синаптическом контакте окончания афферентов на нейронах пириформной коры.

В пириформной коре трансгенных мышей в отличие от мышей дикого типа обнаружены аутофаголизосомы. Часто они располагаются около нейронов и глиальных клеток (рис. 4b), либо в нейропиле пириформной коры (рис. 4c).

Содержание маркера астроглии GFAP

В ткани пириформной коры трансгенных животных выявлено значительно более высокое содержание GFAP, превышающее таковое у мышей дикого типа почти в три раза (283 ± 22% от показаний у мышей дикого типа, $U = 17.1$, $p = 0.02$) (рис. 5). Повышенное содержание глиального маркера GFAP может указывать на активацию астроглии в ткани пириформной коры мышей линии 5xFAD.

Иммуногистохимическое исследование распределения НЕП

Статистически значимых различий в интенсивности иммуногистохимического окрашивания НЕП в пириформной коре между мышами дикого типа и трансгенными животными линии 5xFAD выявлено не было (t-test, $t = 1.25$, $p = 0.23$, рис. 6g).

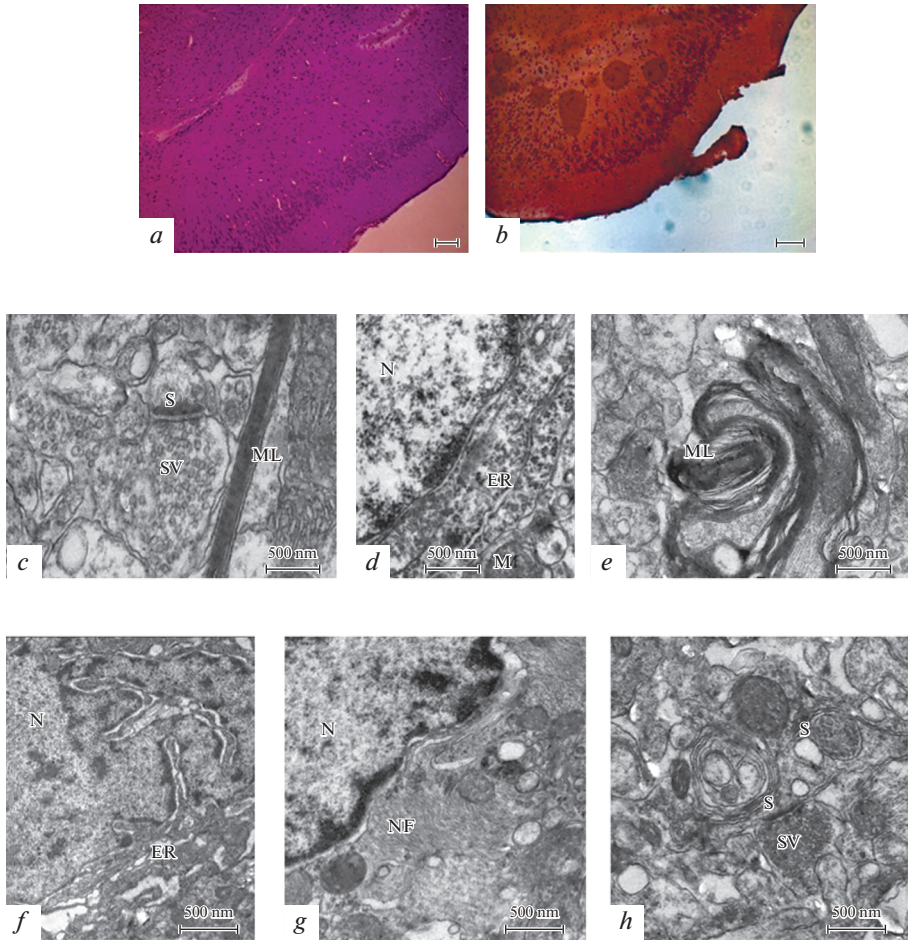


Рис. 3. Структура пириформной коры у мышей дикого типа (*a*, *c*, *d*) и трансгенных мышей линии 5xFAD (*b*, *e*, *f*, *g*, *h*) в возрасте 7 мес. (*a*) – окраска по Нисслю, (*b*) – двойное окрашивание по Нисслю и Конго красным. (*a*–*b*) – масштаб 50 мкм. (*c*–*h*) – электроннограммы участков нейропиля с нейронами в пириформной коре мышей. Обозначение: A – амилоидные образования (бляшки), N – нейроны, S – синаптические контакты, M – митохондрии, ER – ЭПР, ML – миелиновые волокна, NF – нейрофиламенты, L – лизосомы, SV – синаптические пузырьки.

Ранее нами также было показано отсутствие различий в содержании НЕП в обонятельных луковицах, а также снижение его содержания и экспрессии в энторинальной коре [12, 18]. В данном исследовании мы также наблюдали, что в энторинальной коре уровень иммунохимического окрашивания НЕП у мышей линии 5xFAD был выражен слабее, чем у мышей дикого типа (*t*-test, $t = 3.53$, $p = 0.03$, рис. 6h). Более того, сравнительный анализ распределения НЕП у мышей обеих линий в ткани пириформной и соседней энторинальной области коры выявил существенные различия. Так, в пириформной коре иммунопозитивный сигнал НЕП локализовался преимущественно в нейропиле, а тела клеток с повышенным свечением были единичны, при этом их количество не отличалось у мышей дикого типа и линии 5xFAD (Mann–Whitney U-test, $U = 27.5$, $p = 0.66$, рис. 6i). В то же время в соседней энтори-

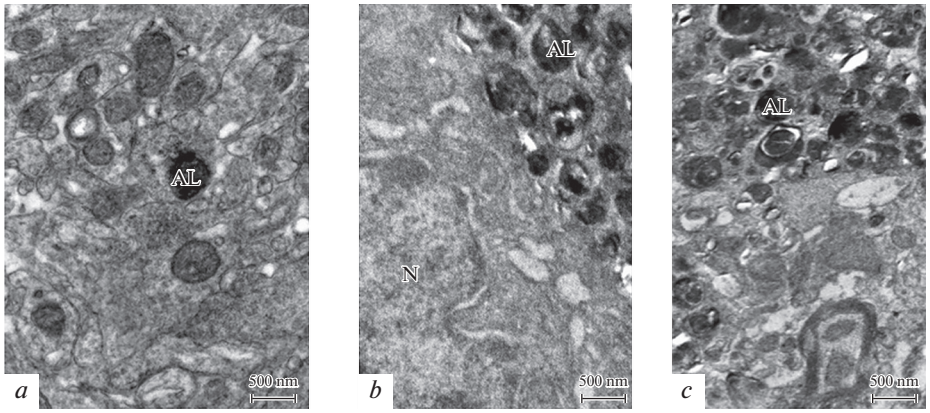


Рис. 4. Электроннограммы участков нейропиля с аутофаголизосомами в обонятельной луковице (*a*) и пириформной коре (*b*, *c*) трансгенных мышей линии 5xFAD в возрасте 7 мес. Обозначение: AL – аутофаголизосомы, N – нейроны.

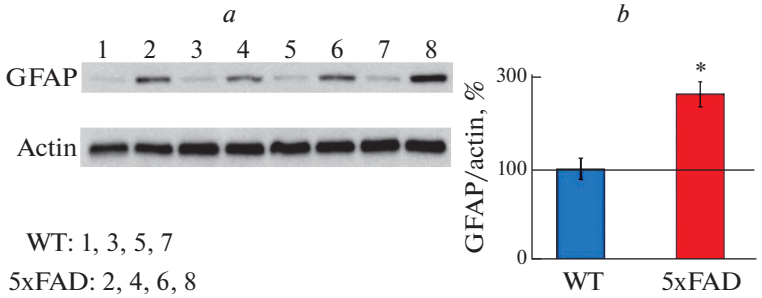


Рис. 5. Исследование содержания астроцитарного маркера глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в ткани пириформной коры у мышей дикого типа (WT) и трансгенных мышей линии 5xFAD). (*a*) – пример иммунохимического окрашивания белка после электрофореза; (*b*) – количественный анализ содержания GFAP. * Статистически значимое различие между 5xFAD и мышами дикого типа (U-тест Манна–Уитни; $p < 0.05$; $n = 4$ в каждой группе). Данные представлены как среднее ± ошибка среднего и выражены в % от уровня контроля (принятого за 100%).

нальной области коры мышей дикого типа, помимо относительно равномерного окрашивания нейропиля, наблюдались многочисленные НЕП-позитивные тела пирамидных нейронов, а у мышей линии 5xFAD таких нейронов было заметно меньше, и их количество составляло 38.6 ± 5.9% от уровня контроля (U-тест Манна–Уитни $U = 3.5$, $p = 0.001$). Таким образом, нами выявлено различие в характере распределения НЕП в пириформной и энторинальной областях коры, а также снижение количества НЕП-позитивных нейронов в энторинальной коре у 5xFAD мышей.

Анализ обонятельного поведения

Сравнительный анализ результативности поиска пищи у мышей линии 5xFAD и дикого типа показал, что трансгенные мыши были менее успешны в поиске пищи и в среднем набирали в два раза меньше баллов, чем их сверстники дикого типа ($t = 41.5$,

$p = 0.04$, рис. 7a). Более детальный анализ полученных данных показал, что соотношение трансгенных мышей, выполнявших безуспешный, 50%- или 100%-ный поиск, было равномерным (рис. 7b). Мыши дикого типа чаще (H = 17.762, $p = 0.003$, тест Крускала–Уолиса с пост-хок анализом Стьюдента–Ньюмана–Кеулса $p < 0.05$) демонстрировали 100%-ный поиск, в то время как безуспешный поиск у них наблюдался достаточно редко (H = 17.762, $p = 0.003$, тест Крускала–Уолиса с пост-хок анализом Стьюдента–Ньюмана–Кеулса $p < 0.05$). При сопоставлении (H = 17.762, $p = 0.003$, тест Крускала–Уолиса) со сверстниками дикого типа трансгенные мыши в 7.6 раз чаще ($p < 0.05$, пост-хок анализ Стьюдента–Ньюмана–Кеулса) демонстрировали безуспешный поиск с нулевым результатом и в 2 раза реже ($p < 0.05$, пост-хок анализ Стьюдента–Ньюмана–Кеулса) находили оба куска пищи (рис. 7b).

По индексу поисковой активности трансгенные мыши не отличались от мышей дикого типа (H = 15.40, $p = 0.082$, ANOVA on Ranks), за исключением первого дня тестирования, когда мотивация поиска у мышей дикого типа была существенно выше ($t = 2.90$, $p = 0.010$, рис. 7c).

В процессе тестирования с 1-х по 5-е сутки было обнаружено, что у мышей дикого типа наблюдается позитивная динамика выполнения поиска пищи: сокращалось число обнюхиваний отверстий до первого обнаружения корма ($F_{4,47} = 6.97$, $p < 0.001$, ANOVA) – начиная со второго дня тестирования этот параметр существенно снижался ($p < 0.01$, пост-хок анализ Стьюдента–Ньюмана–Кеулса, рис. 7e), а к пятому дню тестирования существенно сокращалась и продолжительность поиска корма ($t = 3.34$, $p = 0.010$, рис. 7e). В отличие от мышей дикого типа у трансгенных 5xFAD мышей позитивная динамика выполнения поиска пищи (по продолжительности поиска корма) не наблюдалась. К пятому дню тестирования продолжительность поиска у трансгенных мышей была в 1.8 раз больше, чем у мышей дикого типа ($U = 85$, $p = 0.036$, рис. 7e).

Сниженную результативность поиска пищи у мышей линии 5xFAD по сравнению с мышами дикого типа (линия C57Bl) можно интерпретировать как свидетельство нарушения обонятельной функции у этих животных.

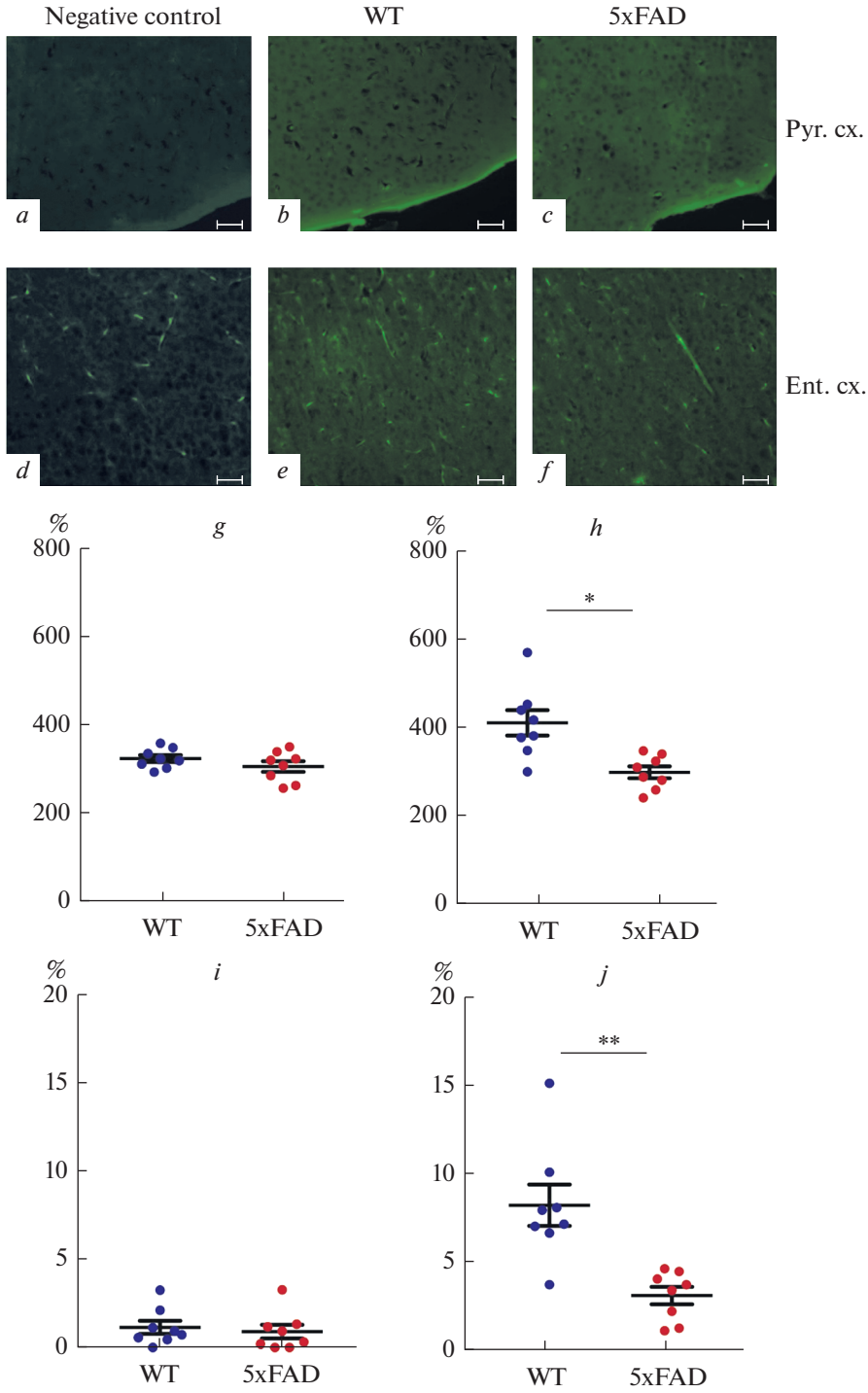
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

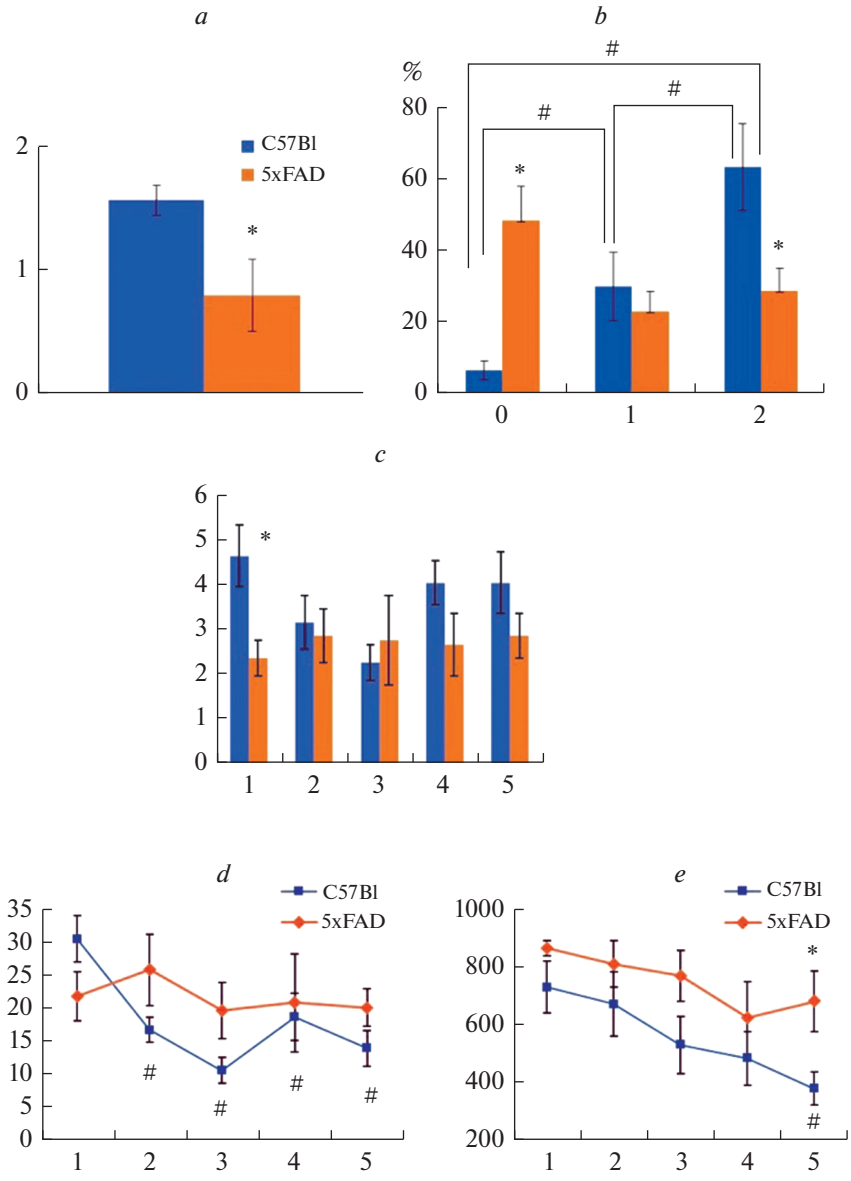
Основной путь передачи сигнала в обонятельной системе млекопитающих (рис. 1a) начинается с сенсорных нейронов обонятельного эпителия, развивающегося из обонятельной плакоды во время эмбриогенеза. Аксоны первично-чувствующих

Рис. 6. Распределение металлопептидазы неприлизин (НЕП) (FITC-позитивный сигнал зеленого цвета) в пириформной (Pyr. cx., *a–c*) и энторинальной коре (Ent. cx., *d–f*) у 7-месячных мышей дикого типа (*b*, *e*) и мышей линии 5xFAD (*c*, *f*). (*a*, *d*) – негативный контроль иммуногистохимического окрашивания ткани мозга мыши дикого типа (в отсутствие первичных антител к НЕП иммунохимическая реакция не наблюдается). Масштабные отрезки: 60 мкм.

(*g*, *h*) – результаты денситометрического анализа яркости свечения FITC-позитивных структур в ткани пириформной (Pyr. cx. *g*) и энторинальной коры (Ent. cx. *h*) мышей дикого типа (синие точки, $n = 8$) и мышей линии 5XFAD (красные точки, $n = 8$); данные представлены в виде среднего значения и его ошибки в % от уровня среднего значения свечения FITC в ткани негативного контроля; различия между группами животных достоверны при * $p < 0.05$ (*t*-test).

(*i*, *j*) – результаты морфометрического анализа количества НЕП-позитивных клеток (тела клеток с яркостью свечения более 300% от яркости окружающего межклеточного пространства) в ткани пириформной (Pyr. cx. i) и энторинальной коры (Ent. cx. *j*) мышей дикого типа (синие точки, $n = 8$) и мышей линии 5XFAD (красные точки, $n = 8$); данные представлены в виде среднего количества клеток на поле площадью 10000 мкм^2. Различия между группами животных достоверны при ** $p < 0.01$ (U-тест Манна–Уитни).


Negative control
WT
5xFAD
Pyr. cx.
Ent. cx.
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
%
800
600
400
200
0
20
15
10
5
*
**
WT
5xFAD



нейронов формируют обонятельный нерв, который проецируется в обонятельную луковицу (OB; выпячивание из конечного мозга) и образует синапсы с апикальными дендритами митральных/пучковых клеток, давая начало гломерулам обонятельных луковиц. Первичные аксоны проекционных нейронов обонятельных луковиц (митральные и пучковые клетки), преимущественно иннервируют узкую область вентро-латеральной части конечного мозга, образуя латеральный обонятельный тракт (LOT), прилегающий к пиальной поверхности мозга [22]. Аксоны LOT дают коллатеральные ответвления в обонятельных областях коры, в том числе в пириформной и энторинальной областях (рис. 1а), имеющих тесные функцио-

Рис. 7. Сравнительный анализ эффективности поиска пищи у мышей C57Bl и 5xFAD.

(*a*) – ось ординат: усредненная по группам результативность поиска пищи в баллах. * $p < 0.05$ – различия между C57Bl и 5xFAD группами мышей, *t*-тест.

(*b*) – ось ординат: доля мышей (%), достигших определенного результата (0, 1 или 2) в поиске пищи от общего количества мышей в каждой группе, принятого за 100%. Ось абсцисс: результат поиска пищи в баллах. # $p < 0.05$ – внутригрупповые различия и * $p < 0.05$ – межгрупповые различия, тест Крускала–Уолиса $H = 17.8$, $p = 0.03$ с пост-хок анализом Стьюдента–Ньюмана–Келюса.

(*c*) – ось ординат: индекс поисковой активности. Ось абсцисс: номер цикла тестирования. * $p = 0.01$ – межгрупповые различия, *t*-тест.

(*d*) – ось ординат: число обнюхиваний отверстий за цикл тестирования. Ось абсцисс: номер цикла тестирования. # $p < 0.05$ – внутригрупповые различия, One Way ANOVA $F4.47 = 6.97$, $p < 0.001$ с пост-хок анализом Стьюдента–Ньюмана–Кеулса.

(*e*) – ось ординат: продолжительность поиска корма за цикл тестирования в секундах. Ось абсцисс: номер цикла тестирования. * $p = 0.036$ – межгрупповые различия, тест Манна–Уитни; # $p < 0.05$ – внутригрупповые различия между первым и пятым циклами тестирования, *t*-тест. Все данные представлены в виде среднего ± ошибка среднего.

нальные связи с таламическими ядрами (пириформная кора), гиппокампальной формацией и миндалиной (энторинальная кора).

При морфофункциональном исследовании разных отделов обонятельного анализатора периферического отдела (обонятельных луковиц) и центральных отделов – гиппокампа, энторинальной и пириформной областей коры у 7-месячных трансгенных мышей линии 5xFAD обнаружены амилоидоз и аутофаголизосомы в нервной ткани. При электронномикроскопическом исследовании пириформной коры, получающей прямые обонятельные проекции волокон от обонятельных луковиц, выявлено, что наблюдаемые изменения более выражены по сравнению с энторинальной корой. Это проявляется в виде амилоидоза с интенсивным накоплением Aβ и гибелью нейронов, нейрофиламентозной дегенерации, деструкции миелиновой оболочки волокон, поражении синаптических окончаний, связанным с агглютинацией синаптических пузырьков. Последнее может приводить к нарушению выделения нейромедиаторов в области синаптических контактов афферентных волокон на нейронах пириформной коры.

Обнаруженное нами повышение содержания маркерного белка астроглии GFAP в пириформной коре мышей линии 5xFAD указывает на активацию астроцитов, инициированную нейровоспалительными и нейродегенеративными процессами, вызванными амилоидогенезом, что согласуется с результатами, полученными ранее на этой линии животных [1]. Повышение содержания астроцитов при развитии генетически-обусловленных форм БА выявляется и при позитронно-эмиссионной томографии мозга пациентов, причем развитие астроглиоза предшествует накоплению амилоидных бляшек [23]. Схожие данные получены и у трансгенных мышей линии APPswe, у которых увеличение числа астроцитов наблюдается по мере развития патогенетических изменений в коре и гиппокампе, начиная с 6-месячного возраста [24].

Ранее мы проводили исследования распределения амилоид-деградирующей металлопептидазы неприлизина (НЕП) в ткани обонятельной луковицы, гиппокампа и энторинальной области коры как у крыс, перенесших пренатальную гипоксию [17], так и у трансгенных мышей линии 5xFAD [12]. Поскольку в настоящей работе мы использовали тот же протокол иммунофлуоресцентного исследования, это дало нам возможность впервые провести сравнение распределения НЕП в ткани различных отделов мозга трансгенных мышей и животных дикого типа. Результаты исследования распределения металлопептидазы НЕП в обонятельной луковице и энторинальной области коры в рамках данной работы согласуются с данными, по-

лученными нами ранее на этой же модели [12], однако данные о распределении НЕП в пириформной коре получены нами впервые. В пириформной коре НЕП локализуется преимущественно в межклеточном пространстве, тогда как в энторинальной присутствуют НЕП-позитивные клеточные тела. Можно предположить, что различия в общем уровне иммунохимического окрашивания в пириформной и энторинальной областях коры во многом определяются наличием в энторинальной коре большего числа клеток с повышенным уровнем содержания НЕП. Более того, в энторинальной коре 5xFAD мышей количество таких клеток существенно ниже, чем у мышей дикого типа, тогда как в пириформной коре, где эти клетки единичны в обеих группах, такие различия между линиями животных ярко не выражены. Интересно отметить, что в гиппокампе клетки с повышенным содержанием НЕП в телах также встречаются редко, как и в пириформной коре [12]. В ткани обонятельных луковиц мышей и крыс НЕП локализован как в телах клеток, так и в нейропиле и его содержание намного выше, чем в корковых структурах как на уровне мРНК, так и белка [15, 17, 18]. Наибольшее его количество отмечено в центральный области, в проводящих пучках белого вещества и паттерн распределения НЕП стабильно воспроизводится у крыс [17] и мышей – как дикого типа, так и линии 5xFAD [18].

Снижение экспрессии НЕП на уровне мРНК и белкового продукта у мышей линии 5xFAD относительно мышей дикого типа коррелирует с накоплением и агрегацией амилоидного пептида, приводящее к образованию амилоидных бляшек в межклеточном пространстве [18] и в зонах расположения волокон белого вещества. Также нами ранее было показано различие в общем уровне экспрессии НЕП в различных отделах головного мозга крыс [15], что в совокупности с данными иммуногистохимии свидетельствует о наличии специфических особенностей экспрессии данного гена в отделах мозга, характеризующихся различным временным диапазоном появления амилоидных депозитов при развитии БА (сначала в корковых структурах и позже в стриатуме) [25]. Закономерности, стоящие за наблюдающимися отличиями в распределении НЕП в различных отделах головного мозга у животных, нуждаются в дальнейшем изучении.

Наблюдаемые нами патологические изменения в обонятельных луковицах и пириформной коре могут быть причиной ослабления обонятельной функции у трансгенных мышей, которое выражается в снижении результативности поиска пищи по запаху на фоне одинаковой поисковой активности по сравнению с мышами дикого типа. Это согласуется с данными, полученными на другой линии трансгенных мышей 3xTg-AD, у которых также наблюдался более длительный период поиска пищи и нарушение обонятельной функции, по сравнению с мышами дикого типа, по мере накопления амилоидных отложений [26]. Нарушение обонятельной функции у мышей линии 5xFAD было также показано в нашем предыдущем исследовании [18], когда помимо когнитивного дефицита у этих животных, наблюдаемого при обучении в водном лабиринте Морриса, мы обнаружили потерю предпочтения к запаху масла валерианы, компоненты которого имеют феромональную значимость для грызунов [27]. В литературе также есть данные, свидетельствующие о существенных нарушениях в функционировании сенсорных нейронов в обонятельных луковицах 5xFAD мышей, выражающиеся в изменении пространственного распределения кальциевой сигнализации в ответ на стимуляцию одорантами [28], что согласуется с нашими данными о нарушении предпочтения к запаху валерианы. Нарушение обонятельной функции также наблюдается и у человека на ранних стадиях развития болезней Альцгеймера и Паркинсона [9, 29, 30], что делает изучение механизмов нарушения обонятельной функции с использованием трансгенных животных важным и актуальным.

Поскольку НЕП расщепляет основной нейромедиатор обонятельной сигнализации соматостатин [31], уровень которого очень высок в обонятельных луковицах [32], повышенная экспрессия НЕП на уровне мРНК и белка в этом отделе обонятельного анализатора свидетельствует о важной роли этого фермента в проведении обонятельного сигнала. Это, вероятно, объясняет и тот факт, что экспрессия НЕП в обонятельных луковицах остается высокой в течение всей продолжительности жизни и снижается только к старости, чему соответствует снижение обонятельной функции у экспериментальных животных [33]. В более раннем возрасте нарушение обонятельной функции, коррелирующее с пониженной экспрессией НЕП в корковых структурах обонятельного анализатора, наблюдается у крыс, перенесших пренатальную гипоксию [15]. Аналогичным образом снижение уровня экспрессии НЕП в теменной и энторинальной коре, а также гиппокампе у 5xFAD мышей [16] может быть причиной нарушения у них проведения обонятельного стимула, наблюдаемого нами как в тесте поиска пищи, так и распознавания запахов. Интересно, что повышение экспрессии НЕП у перенесших пренатальную гипоксию крыс, после введения им ингибитора деацетилаз гистонов вальпроата натрия или ингибитора каспаз Ac-DEVD-CHO, приводило к восстановлению у них нарушений в обонянии, вызванных пренатальной патологией [15, 16]. Введение вальпроата натрия трансгенным мышам, моделирующим БА, также приводило у них к снижению числа амилоидных бляшек и улучшению когнитивных функций [34]. Принимая во внимание, что НЕП является основным амилоид-деградирующим ферментом в ткани мозга [13], а его экспрессия в нервных клетках регулируется на эпигенетическом уровне посредством деацетилаз гистонов [35], в настоящее время нами проводится исследование влияния инъекций вальпроата натрия на уровень экспрессии и обонятельного поведения мышей линии 5xFAD и предварительные данные позволяют предположить, что повышение экспрессии НЕП в структурах мозга, отвечающих за проведение обонятельного стимула, будет позитивно коррелировать с уровнем их обонятельной функции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследование у трансгенных мышей линии 5xFAD нейродегенеративных изменений в ткани пириформной коры, получающей прямые входы из обонятельной луковицы, свидетельствует о наличии в пириформной коре большого количества амилоидных образований, распаде миелиновых волокон, дегенеративных изменениях синаптических окончаний, образовании обширных областей с аутофаголизосомами, усилении глиальной реакции (GFAP) и изменении уровня экспрессии и распределения НЕП. У этих животных также отмечается нарушение обонятельной функции. Многие из описанных признаков наблюдаются и в ткани мозга человека при развитии БА. Нарушение обоняния, наблюдаемое на самых ранних стадиях БА, может свидетельствовать о повреждении системы проведения обонятельных стимулов при развитии амилоидоза, что делает анализ обонятельной функции важным критерием для ранней диагностики этого заболевания. В связи с этим исследования молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в основе изменений обонятельной функции экспериментальных животных, вызванных повышенным образованием амилоидного пептида или нарушением его клиренса, являются исключительно важными и перспективными как для понимания основных молекулярных механизмов патогенеза БА, так и для создания направленной терапии этого и других заболеваний, сопровождающихся нарушением обоняния.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Центру коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований (ЦКП) Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Госзадания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (№ 075-00408-21-00).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Т.Н.Л.: морфологические исследования, написание статьи; В.Д.С.: морфологические и иммуногистохимические исследования, статистическая обработка данных, редактирование статьи; Д.Н.М.: поведенческие эксперименты и статистическая обработка данных; Н.Н.Н.: анализ данных, написание и редактирование текста статьи, общее руководство выполнением работы. Текст и графические изображения статьи одобрены всеми соавторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Oakley HO, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, 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: 10129–10140. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006
2. *Mirzaei N, Tang SP, Ashworth S, Coello C, Plisson C, Passchier J, Selvaraj V, Tyacke RJ, Nutt DJ, Sastre M* (2016) In vivo imaging of microglial activation by positron emission tomography with [(11)C]PBR28 in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. Glia 64: 993–1006. https://doi.org/10.1002/glia.22978
3. *Eimer WA, Vassar R* (2013) Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Abeta42 accumulation and Caspase-3 activation. Mol Neurodegener 8: 2. https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-2
4. *Devi L, Ohno M* (2010b) Phospho-eIF2α level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD mice. PLoS One 5: e12974. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012974
5. *Shao CY, Mirra SS, Sait HB, Sacktor TC, Sigurdsson EM* (2011) Postsynaptic degeneration as revealed by PSD-95 reduction occurs after advanced Aβ and tau pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol 122: 285–292. https://doi.org/10.1007/s00401-011-0843-x
6. *Neuman KM, Molina-Campos E, Musial TF, Price AL, Oh KJ, Wolke ML, Buss EW, Scheff SW, Mufson EJ, Nicholson DA* (2015) Evidence for Alzheimer's disease-linked synapse loss and compensation in mouse and human hippocampal CA1 pyramidal neurons. Brain Struct Funct 220: 3143–3165. https://doi.org/10.1007/s00429-014-0848-z
7. *Kimura R, Ohno M* (2009) Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. Neurobiol Dis 33: 229–235. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.006
8. *Kanno T, Tsuchiya A, Nishizaki T* (2014) Hyperphosphorylation of Tau at Ser396 occurs in the much earlier stage than appearance of learning and memory disorders in 5XFAD mice. Behav Brain Res 274: 302–306. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.034
9. *Murphy C* (2019) Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease. Nat Rev Neurol 15: 11–24. https://doi.org/10.1038/s41582-018-0097-5
10. *Cai Y, Xue ZQ, Zhang XM, Li MB, Wang H, Luo XG, Cai H, Yan XX* (2012) An age-related axon terminal pathology around the first olfactory relay that involves amyloidogenic protein overexpression without plaque formation. Neurosci 215: 160–173. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.043

11. *Gaudel F, Stephan D, Landel V, Sicard G, Féron F, Guiraudie-Capraz G* (2018) Expression of the Cerebral Olfactory Receptors Olfr110/111 and Olfr544 Is Altered During Aging and in Alzheimer's Disease-Like Mice. Mol Neurobiol 56: 2057–2072.
https://doi.org/10.1007/s12035-018-1196-4
12. *Туманова НЛ, Васильев ДС, Дубровская НМ, Наливаева НН* (2022) Морфофункциональные изменения нервной ткани мозга трансгенных мышей линии 5xFAD. Цитология 64: 159–171. [*Tumanova NL, Vasilev DS, Dubrovskaya NM, Nalivaeva NN* (2022) Morphofunctional changes in the brain tissue of 5xFAD transgenic mice. Cell Tiss Biol 64: 159–171. (In Russ)].
https://doi.org/10.31857/S0041377122020080
13. *Nalivaeva NN, Turner AJ* (2019) Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy. Br J Pharmacol 176: 3447–3463.
https://doi.org/10.1111/bph.14593
14. *Nalivaeva NN, Zhuravin IA, Turner AJ* (2020) Neprilysin expression and functions in development, ageing and disease. Mech Ageing Dev 192: 111363.
https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111363
15. *Vasilev DS, Dubrovskaya NM, Zhuravin IA, Nalivaeva NN* (2021) Developmental Profile of Brain Neprilysin Expression Correlates with Olfactory Behaviour of Rats. J Mol Neurosci 71: 1772–1785.
https://doi.org/10.1007/s12031-020-01786-3
16. *Vasilev D, Dubrovskaya NM, Nalivaeva, NN* (2022) Caspase Inhibition Restores NEP Expression and Rescues Olfactory Deficit in Rats Caused by Prenatal Hypoxia. J Mol Neurosci 72: 1516–1526.
https://doi.org/10.1007/s12031-022-01986-z
17. *Tumanova NL, Vasilev DS, Dubrovskaya NM, Nalivaeva NN, Zhuravin IA* (2021) Effect of Prenatal Hypoxia on Cytoarchitectonics and Ultrustructural Organisation of Brain Regions Related to Olfaction in Rats. Cell Tiss Biol 15: 482–492.
https://doi.org/10.1134/S1990519X21050114
18. *Vasilev DS, Dubrovskayaa NM, Tumanova NL, Nalivaeva NN* (2022) Analysis of Expression of the Amyloid-Degrading Enzyme Neprilysin in Brain Structures of 5xFAD Transgenic Mice. J Evol Biochem Physiol 58: 193–203.
https://doi.org/10.1134/S0022093022010173
19. *Paxinos G, Franklin KBJ* (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd Edition. Acad. Press. San Diego.
https://doi.org/10.1084/jem.20081588
20. *Tumanova NL, Vasil'ev DS, Dubrovskaya NM, Zhuravin IA* (2018) Ultrastructural alterations in the sensorimotor cortex upon delayed development of motor behavior in early ontogenesis of rats exposed to prenatal hypoxia. Cell Tiss Biol 12: 419–425.
https://doi.org/10.1134/S1990519X18050097
21. *Sun S, Li T, Davies H, Li W, Yang J, Li S, Ling S* (2016) Altered Morphologies and Functions of the Olfactory Bulb and Hippocampus Induced by miR-30c. Front Neurosci 10: 207.
https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00207
22. *De Castro F* (2009) Wiring olfaction: The cellular and molecular mechanisms that uide the development of synaptic connections from the nose to the cortex. Front Neurosci 3: 52.
https://doi.org/10.3389/neuro.22.004.2009
23. *Schöll M, Carter SF, Westman E, Rodriguez-Vieitez E, Almkvist O, Thordardottir S, Wall A, Graff C, Långström B, Nordberg A* (2015) Early astrocytosis in autosomal dominant Alzheimer's disease measured in vivo by multi-tracer positron emission tomography. Sci Rep 5: 16404.
https://doi.org/10.1038/srep16404
24. *Rodriguez-Vieitez E, Ni R, Gulyás B, Tóth M, Häggkvist J, Halldin C, Voytenko L, Marutle A, Nordberg A* (2015) Astrocytosis precedes amyloid plaque deposition in Alzheimer APPswe transgenic mouse brain: a correlative positron emission tomography and in vitro imaging study. Eur J Nucl Med Mol Imaging 42: 1119–1132.
https://doi.org/10.1007/s00259-015-3047-0
25. *Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H* (2002) Phases of A β-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology 58: 1791–1800.
https://doi.org/10.1212/WNL.58.12.1791
26. *Mitrano DA, Houle SE, Pearce P, Quintanilla RM, Lockhart BK, Genovese BC, Schendzielos RA, Croushore EE, Dymond EM, Bogenpohl JW, Grau HJ, Smith Webb L* (2021) Olfactory dysfunction in the 3xTg-AD model of Alzheimer's disease. IBRO Neurosci Rep 10: 51–61.
https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2020.12.004
27. *Мельник СА, Гладышева ОС, Крылов ВН* (2009) Возрастные изменения обонятельной чувствительности самцов мышей к запаху изовалериановой кислоты. Сенсорные системы 23: 151–155. [*Melnik SA, Gladysheva OS, Krylov VN* (2009) Age-related changes in the olfactory sensitivity of male mice to the smell of isovaleric acid. Sensory Systems 23: 151–155. (In Russ)].

28. *Son G, Yoo S-J, Kang S, Rasheed A, Jung DH, Park H, Cho B, Steinbusch HWM, Chang K-A, Suh Y-H, Moon C* (2021) Region-specific amyloid-β accumulation in the olfactory system influences olfactory sensory neuronal dysfunction in 5xFAD mice. Alzheimers Res Ther 13: 4. https://doi.org/10.1186/s13195-020-00730-2
29. *Djordjevic J, Jones-Gotman M, De Sousa K, Chertkow H* (2008) Olfaction in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 29: 693–706. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.014
30. *Doty RL* (2012) Olfactory dysfunction in Parkinson disease. Nat Rev Neurol 8: 329–339. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80
31. *Lepousez G, Mouret A, Loudes C, Epelbaum J, Viollet C* (2010) Somatostatin contributes to in vivo gamma oscillation modulation and odor discrimination in the olfactory bulb. J Neurosci 30: 870–875. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4958-09.2010
32. *Nocera S, Simon A, Fiquet O, Chen Y, Gascuel J, Datiche F, Schneider N, Epelbaum J, Viollet C* (2019) Somatostatin serves a modulatory role in the mouse olfactory bulb: Neuroanatomical and behavioral evidence. Front Behav Neurosci 13: 61. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00061
33. *Dubrovskaya NM, Vasilev DS, Tumanova NL, Alekseeva OS, Nalivaeva NN (*2022*)* Prenatal Hypoxia Impairs Olfactory Function in Postnatal Ontogeny in Rats. Neurosci Behav Physiol 52: 262–270. https://doi.org/10.1007/s11055-022-01233-3
34. *Qing H, He G, Ly PTT, Fox CJ, Staufenbiel M, Cai F, Zhang Z, Wei S, Sun X, Chen C-H, Zhou W, Wang K, Song W* (2008) Valproic acid inhibits Aβ production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. J Exp Med 205: 2781–2789. https://doi.org/0.1084/jem.20081588
35. *Belyaev ND, Nalivaeva NN, Makova NZ, Turner AJ* (2009) Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. EMBO Rep 10: 94–100. https://doi.org/10.1038/embor.2008.222

Neurodegenerative Changes in the Structural and Ultrastructural Organization in the Pyriform Cortex of 5xFAD Transgenic Mice

N. L. Tumanova[a], D. S. Vasilev[a, *], N. M. Dubrovskaya[a], and N. N. Nalivaeva[a]

[a]*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, Russia*
**e-mail: dvasilyev@bk.ru*

Analysis of pathological changes in the structural and functional organization of the pyriform cortex in mice of the 5xFAD line, modeling the pathogenesis of Alzheimer's disease, showed that at the age of 7 months there is an increased aggregation of β-amyloid peptide, neuronal death, disintegration of myelin sheaths of nerve fibers, agglutination of synaptic vesicles in synaptic endings and the appearance of a large number of autophagolysosomes in the bodies and processes of neurons. Also, in the pyriform cortex of such animals, foci of gliosis and an almost threefold increase in the content of the glial marker protein GFAP compared with wild type animals were found. All these disorders were more pronounced than in the entorhinal cortex of 5xFAD mice we had previously studied. Between the pyriform and entorhinal regions, a difference in the distribution of amyloid-degrading metallopeptidase neprilysin (NEP) was also revealed. In the pyriform cortex, this enzyme is found mainly in the intercellular space, and in the entorhinal cortex - in the cell bodies. Moreover, in the entorhinal cortex of 5xFAD mice the number of NEP-positive cells was 60% lower than in wild-type mice. 5xFAD mice also showed a significant deterioration in olfactory function, which was expressed in an almost twofold decrease in the effectiveness of the search for food by smell compared to wild-type mice. These findings suggest significant pathological changes in the pyriform and entorhinal cortex in 5xFAD mice caused by amyloid accumulation, which may cause a deterioration in their sense of smell, and similarly might cause impaired olfactory function in the development of Alzheimer's disease.

Keywords: electron microscopy, 5xFAD transgenic mice, olfactory bulbs, piriform cortex, entorhinal cortex, neurodegeneration, amyloid peptide, neprilysin, sense of smell

EDN: VZXMHG
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 8, с. 1015–1027

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МЕЛАНОКОРТИНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ 1-ГО ТИПА В ГИПОТАЛАМУСЕ МЫШЕЙ В НОРМЕ И ПРИ ДИЕТА-ИНДУЦИРОВАННОМ ОЖИРЕНИИ

© 2022 г. Е. В. Михайлова[1], К. В. Деркач[1], А. О. Шпаков[1], И. В. Романова[1, *]

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

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

Поступила в редакцию 26.05.2022 г.
После доработки 17.06.2022 г.
Принята к публикации 20.06.2022 г.

Меланокортиновая система в гипоталамусе играет ключевую роль в регуляции пищевого поведения и периферического метаболизма, и в условиях метаболических расстройств ее активность существенно меняется. Однако возможная роль в этом меланокортиновых рецепторов 1-го типа (MC1R) остается не выясненной, тем более что данные об экспрессии и локализации этого рецептора в гипоталамусе позвоночных животных фрагментарны. Цель исследования состояла в изучении экспрессии и распределения MC1R в гипоталамусе контрольных мышей и животных с диета-индуцированным ожирением (ДИО) и в их сопоставлении с экспрессией других компонентов меланокортиновой системы и гипоталамической локализацией маркера микроглиоза IBA1. ДИО вызывали 16-недельной диетой, обогащенной легкими углеводами и насыщенными жирами, у самок мышей C57Bl/6J, что также приводило к нарушенной толерантности к глюкозе, гиперлептинемии и гиперинсулинемии. С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения было показано, что в аркуатном ядре гипоталамуса мышей MC1R локализованы на проопиомеланокортин (POMC)-иммунопозитивных нейронах. В условиях ДИО количество MC1R и POMC в гипоталамических нейронах значительно возрастало. Наряду с этим в гипоталамусе ДИО-мышей повышались уровни мРНК для MC1R, MC3R и POMC, что указывает на повышение экспрессии основных компонентов меланокортиновой системы при ДИО. В аркуатных ядрах гипоталамуса ДИО мышей повышалось оцениваемое иммуногистохимическими методами содержание маркера микроглиального воспаления IBA1, что может свидетельствовать о взаимосвязи между MC1R-сигнальными каскадами и активностью воспалительных процессов в гипоталамусе в условиях ДИО. Таким образом, нами впервые показана экспрессия MC1R и его локализация на POMC-иммунопозитивных нейронах в аркуатных ядрах гипоталамуса, их увеличение при ДИО и возможную взаимосвязь с гипоталамической экспрессией POMC и маркера воспаления IBA1, что может свидетельствовать о роли MC1R, как потенциального регулятора периферического метаболизма и нейровоспаления в норме и при метаболических расстройствах.

Ключевые слова: меланокортиновый рецептор 1 типа, про-опиомеланокортин, диета-индуцированное ожирение, гипоталамус, нейровоспаление

DOI: 10.31857/S0869813922080052

Гипоталамическая меланокортиновая система играет исключительно важную роль в контроле пищевого поведения, периферического метаболизма, функций

нервной и нейроэндокринной систем, в основе чего лежит обеспечение интеграции в единую функциональную сеть множества сигнальных систем мозга [1–4]. Компонентами меланокортиновой системы являются сопряженные с гетеротримерными G-белками меланокортиновые рецепторы (MCR) и их эндогенные лиганды – наделенные агонистической активностью меланокортиновые пептиды и выполняющий функцию антагониста агутиподобный пептид (AgRP). Прекурсором меланокортиновых пептидов является про-опиомеланокортин (POMC), который широко экспрессируется на периферии и в различных отделах мозга, в том числе в гипоталамических нейронах [1, 5, 6]. В ходе сайт-специфичного протеолиза из POMC генерируются α-, β- и γ-меланоцитстимулирующие гормоны (MSH) и адренокортикотропный гормон. В мозге наиболее значительные популяции синтезирующих POMC нейронов локализованы в аркуатных ядрах гипоталамуса (arcuate nucleus – ARC) [1].

Мишенями MSH являются пять типов MCR – MC1R–MC5R, которые в активированном гормонами состоянии стимулируют G_s-белки и через них фермент аденилатциклазу, катализирующую синтез универсального вторичного посредника цАМФ [6, 7]. Повышение уровня цАМФ приводит к активации протеинкиназы А и других цАМФ-зависимых эффекторных белков, обеспечивая реализацию основных физиологических эффектов меланокортиновых пептидов в ЦНС и на периферии [7, 8]. В настоящее время принято считать, что в мозге в основном экспрессируются MC3R и MC4R, которые стимулируются α-MSH и, в меньшей степени, другими пептидами меланокортинового семейства [3, 7, 9]. Эти же рецепторы ингибируются нейропептидом AgRP, который продуцируется AgRP/нейропептид Y-экспрессирующими нейронами, причем AgRP не только снижает индуцированную α-MSH стимуляцию MC3R и MC4R, но и ослабляет конститутивную активность этих рецепторов [4, 10]. В последние годы появились данные о том, что в регуляции функций ЦНС может быть вовлечен и MC1R, который до этого рассматривали как преимущественно “периферический” MCR [11]. С помощью иммуногистохимии у мышей MC1R выявлены в нейронах черной субстанции [12], а методом ПЦР экспрессия гена *Mc1r* выявлена в разных областях мозга крысы [13] и в гипоталамусе костистой рыбы (*Epinephelus coioides*) [14]. При этом локализация MC1R в структурах мозга и его функции не были изучены.

Ожирение и сахарный диабет 2-го типа приводят к значительным изменениям функционирования гипоталамической меланокортиновой системы мозга, что показано у пациентов с метаболическими расстройствами [3, 4, 15, 16] и у грызунов с экспериментальными моделями этих заболеваний [3, 4, 17–19]. При этом в гипоталамусе отмечается как нарушение баланса факторов пищевого поведения, регулирующих меланокортиновую систему (POMC, AgRP), так и изменение экспрессии MC3R и MC4R. В то же время данные об экспрессии гена *Mc1r*, кодирующего MC1R, и распределения этого белка в гипоталамических нейронах в условиях метаболических расстройств отсутствуют. Не выяснена возможная взаимосвязь между изменением экспрессии MC1R и других MCR, а также с интенсивностью нейровоспалительных процессов, которые играют важную роль в развитии нейродегенеративных изменений в гипоталамусе и являются индукторами нарушений функционирования гипоталамических сигнальных систем и зависимых от них физиологических процессов. В этом отношении наибольший интерес представляет исследование взаимосвязи между уровнями MC1R и связывающей ионизированный кальций адаптерной молекулы-1 (IBA-1), специфичного маркера микроглии, экспрессия которой в ЦНС условиях нейровоспаления, в том числе индуцированного несбалансированной диетой, возрастает [20–22].

Таким образом, целью работы было изучить экспрессию и распределение MC1R в гипоталамусе контрольных мышей и животных с диета-индуцированным ожире-

нием (ДИО) и сопоставить их с экспрессией других компонентов меланокортиновой системы и локализацией маркера микроглиоза IBA1.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Все эксперименты были проведены в полном соответствии с правилами, разработанными Комитетом по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (редакция 15.02.2018 г.), правилами и требованиями, изложенными в документах "European Communities Council Directive" (2010/63/EEC) и "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". На проведение экспериментов было получено разрешение Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол 01/09 от 8 сентября 2020 г.).

Для исследований были взяты четырехмесячные самки мышей C57Bl/6J (*a/a*), которых получали из питомника Рапполово (Россия). После двухнедельного периода адаптации животные были разделены на 2 группы – контрольные мыши, которых содержали на стандартном сухом корме ("Контроль", $n = 14$), и мыши с ДИО, которое вызывали с помощью длительной (три месяца) высококалорийной диеты, состоящей из животного жира (свиное сало) и 30%-ного раствора сахарозы, заменявшего животным питьевую воду ("ДИО", $n = 14$). Для мониторинга развития ожирения животных взвешивали с периодичностью 1 раз в неделю, а также оценивали количество потребляемого ими корма. Уже через два месяца высококалорийной диеты у мышей наблюдалось достоверное повышенные массы тела (соответственно 23.3 ± 0.8 г в группе "ДИО" и 19.5 ± 0.6 г в контроле, $n = 14$) и уровня глюкозы натощак (5.64 ± 0.23 мМ группе "ДИО" и 4.83 ± 0.15 мМ в контроле, $n = 14$). Из группы "ДИО" были исключены 3 животных с плохо развившимся ожирением (2) или с аномально высокой массой тела (1), и соответственно три животных были исключены из группы "Контроль", в результате чего в дальнейших экспериментах изучали две группы "Контроль" и "ДИО" по 11 мышей в каждой.

Концентрацию глюкозы в крови мышей измеряли с помощью глюкометра "Life Scan Johnson & Johnson" (Дания) и тест-полосок "One Touch Ultra" (США), для чего забирали кровь из хвостовой вены. Оценивали уровни глюкозы натощак и через 120 мин после нагрузки глюкозой (2 г/кг, в/б). Для определения базовых уровней инсулина, лептина и гликированного гемоглобина образцы крови забирали в конце эксперимента из сердца после анестезии животных хлоральгидратом (400 мг/кг, в/б). Концентрацию инсулина и лептина определяли с помощью ИФА-наборов "Mouse Insulin ELISA" (Mercodia AB, Швеция) и "ELISA Kit for Leptin" (Cloud-Clone Corp., США) соответственно. Для определения содержания гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови мышей использовали наборы "Multi Test HbA1c System kit" (Polymer Technology Systems, Inc., США). Также определяли массу висцерального жира (г) и определяли его долю относительно массы тела (%).

Уровень мРНК в гипоталамусе мышей оценивали с помощью ПЦР в реальном времени, для чего из образцов ткани гипоталамуса выделяли тотальную РНК с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия), количественную оценку экспрессии проводили с помощью амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Последовательности используемых праймеров представлены в табл. 1. Для исследования использовали референсные гены – ген гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (*Hprt*) и 18S-субъединицу рибосомальной РНК (*18S-rRNA*). Результаты анализировали с помощью метода $\Delta\Delta C_t$ и программ 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3. Значения RQ

Таблица 1. Структуры прямых (For) и обратных (Rev) праймеров, используемых для амплификации транскриптов целевых генов

Ген	Локализация	Праймер	Размер, bp	NCBI Reference Sequence
Mc1r	For 5'–3' Rev 5'–3'	CTCCACAGACCGCTTCCTAC ACATACAGGCACCAAGGCTC	141	NM_008559.2
Mc3r	For 5'–3' Rev 5'–3'	CAAGGAGATTCTCTGCGGCT TCCCGTCTGAGCGTTGTTTT	101	NM_008561.3
Mc4r	For 5'–3' Rev 5'–3'	GGGTCGGAAACCATCGTCAT TGCAAATGGATGCGAGCAAG	124	NM_016977.4
Pomc	For 5'–3' Rev 5'–3'	CAGTGCCAGGACCTCACC CAGCGAGAGGTCGAGTTTG	72	NM_008895.4
Agrp	For 5'–3' Rev 5'–3'	ACAACTGCAGACCGAGCAGAA CGACGCGGAGAACGAGACT	98	NM_001271806.1
*Hprt**	For 5'–3' Rev 5'–3'	AGCCGACCGGTTCTGTCAT GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC	72	NM_013556.2
*18S-rRNA**	For 5'–3' Rev 5'–3'	GGGAGCCTGAGAAACGGC GGGTCGGGAGTGGGTAATTT	68	NR_003278.3

Примечание. * – праймеры референсных генов – гипоксантингуанинфосфорибозил-трансферазы и 18S-субъединица рибосомальной РНК.

в группе “ДИО” нормировали по их значениям в группе “Контроль”, данные представлены в условных единицах (у. ед.). Для оценки экспрессии из каждой группы мышей случайным образом было отобрано по шесть животных.

Для подготовки образцов мозга с целью проведения иммуногистохимического анализа животных (n = 5 в каждой группе) анестезировали хлоральгидратом (400 мг/кг, в/б), транскардиально перфузировали с помощью 0.1 М натрий-фосфатного буфера (ФБ, pH 7.4) и 4%-ного раствора пара-формальдегида в 0.2 М ФБ. Затем мозг извлекали, дофиксировали в течение ночи в 4%-ном растворе параформальдегида в 0.2 М ФБ (4°C), промывали 0.02 М ФБ с 0.9% NaCl (ФБ-NaCl) и после криопротекции в 30%-ном растворе сахарозы в 0.02 М ФБ-NaCl замораживали в изопентане (при –42°C). Для подготовки срезов мозга из каждой группы мышей случайным образом было отобрано по пять животных.

Для иммуногистохимического анализа были использованы фронтальные срезы мозга (толщиной 16 мкм), которые монтировали на стеклах, как описано нами ранее [23]. От каждого животного из области гипоталамуса получали 10–12 срезов, которые монтировали на стекле Superfrost/plus, высушивали при комнатной температуре и хранили при –20°C. Для исследования отбирали стекла со срезами, содержащими аркуатное ядро гипоталамуса согласно атласу мозга мыши [24]. Флуоресцентное иммуномечение проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [17, 23]. После демаскировки антигена кипячением в натрий-цитратном буфере (pH 6.0), срезы промывали в 0.02 М ФБ-NaCl и блокировали в смеси сывороток цыпленка (3%), козы (3%) и быка (1%), растворенных в ФБ-NaCl, содержащем 0.01% Triton X-100. Затем срезы инкубировали в течение 48 ч (4°C) с первичными антителами. Для двойного иммуномечения использовали смесь первичных антител кролика против MC1R (Elabscience, США) в разведении 1 : 200 с антителами мыши против POMC (Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 1000. Для одиночного иммуномечения использовали первичные антитела кролика против IBA1 (NovusBio, США) в разведении 1 : 500. После тщательной промывки срезы инкуби-

Таблица 2. Масса тела и жировой ткани, уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови и индекс инсулиновой резистентности у контрольных и с диета индуцированным ожирением мышей

	Контроль, $n = 11$	ДИО, $n = 11$
Масса тела, г	20.9 ± 0.6	25.6 ± 0.5*
Масса жировой ткани, г	0.29 ± 0.02	0.64 ± 0.04*
Доля жира, %	1.39 ± 0.05	2.48 ± 0.11*
Глюкоза (тощ.), мМ	5.07 ± 0.11	6.68 ± 0.31*
Глюкоза (стим.), мМ	5.20 ± 0.17	7.82 ± 0.39*
Инсулин, нг/мл	0.39 ± 0.04	0.66 ± 0.06*
Лептин, нг/мл	0.90 ± 0.10	2.01 ± 0.15*
ИР, у. ед.	2.02 ± 0.24	4.59 ± 0.58*
HbA1c, %	4.01 ± 0.19	4.76 ± 0.32

* – различия между группами “Контроль” и “ДИО” статистически значимы при $p < 0.05$. Все значения представлены как $M \pm SEM$.

ровали в течение 1 ч в смеси вторичных антител, конъюгированных с различными флуоресцентными метками: Ig цыпленка против кролика с Alexa-488 и Ig осла против мыши с Alexa-568 (Invitrogen, США) в разведении 1 : 1000. Для выявления IBA1 инкубацию проводили в растворе, содержащем Ig цыпленка против кролика с Alexa-488. После промывки в ФБ срезы заключали под покровное стекло с помощью среды Мовиол (Sigma-Aldrich, США) и хранили при 4°C до полимеризации. Для верификации локализации IBA1 перед заключением под покровное стекло на срезы наносили раствор ядерного красителя DAPI (Sigma, США), разведенного в ФБ-NaCl 1 : 2000 и промывали в ФБ-NaCl. Специфичность иммуногистохимических реакций проверяли негативным контролем (реакции без первичных или вторичных антител). Изображения получали на конфокальном микроскопе DMI6000 с лазерной сканирующей конфокальной установкой “Leica TCS SP5” (Leica Microsystems, Германия), или с мультифотонной установкой. Использовали иммерсионный объектив ×63, лазеры с длиной волны возбуждения 355, 488 и 568 нм. Полученные изображения анализировали посредством пакета программ Leica LAS AF. Значения интенсивности свечения нормировали по их значениям в контроле (у. ед.), в аркуатных ядрах гипоталамуса подсчитывали количество IBA1-иммунопозитивных клеток, результаты представлены в процентах относительно уровня контрольных мышей, принятого за 100%.

Статистический анализ проводили в программе “GraphPad Prism 7” (GraphPad Software, США). Нормальность распределения данных оценивали тестом D’Agostino–Pearson, различия между группами оценивали непарным *t*-тестом и рассматривали как статистически значимые при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мыши, которые в течение трех месяцев находились на высококалорийной диете, имели повышенные массу тела и жировой ткани, увеличенную удельную долю жира, повышенные уровни глюкозы, как натощак, так и через 120 мин после глюкозной нагрузки, а также повышенные уровни инсулина и лептина в крови (табл. 2), что свидетельствует о развитии у них ожирения, нарушенной толерантности к глюкозе, гиперинсулинемии и гиперлептинемии. В группе “ДИО” индекс инсулино-резистентности (ИР), рассчитанный, как произведение концентраций инсулина и глю-

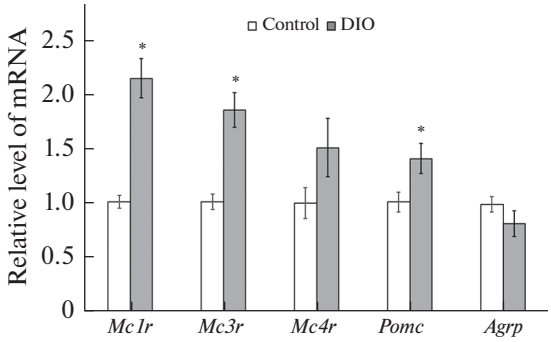


Рис. 1. Экспрессия генов, кодирующих меланокортиновые рецепторы и нейропептиды, контролирующие пищевое поведение, в гипоталамусе мышей контрольных и с диета-индуцированным ожирением. * – различия между группами контроль ("Control") и ДИО ("DIO") статистически значимы при $p < 0.05$, значения представлены в условных единицах.

козы натощак, был значимо выше, чем в группе "Контроль" (табл. 2), что указывает на снижение чувствительности тканей к инсулину и развитие ИР у ДИО-мышей.

Все выявленные метаболические и гормональные изменения указывают на развитие у мышей отчетливо выраженных признаков метаболического синдрома. Ранее нами и другими авторами было показано, что у мышей, получавших различные по длительности диеты, обогащенные насыщенными жирами и легкоусвояемыми углеводами, также имеются ожирение, изменения углеводного и липидного обмена, нарушенная толерантность к глюкозе, ИР и гиперлептинемия [17, 25–27].

Изучение экспрессии генов в гипоталамусе ДИО-мышей показало повышение по сравнению с контролем уровня *Mc1r* (до 2.15 ± 0.18 у. ед., $p < 0.05$) и *Mc3r* (до 1.86 у. ед., $p < 0.05$), при этом экспрессия гена *Mc4r* у ДИО-мышей возрастала в 1.5 раза, но статистически не отличалась от контроля (рис. 1).

Экспрессия гена *Pomc*, кодирующего POMC, прекурсор анорексигенных меланокортиновых пептидов, возрастала (в 1.4 раза, $p < 0.05$), в то время как экспрессия гена *Agrp*, кодирующего орексигенный нейропептид AgRP, менялась слабо (рис. 1). При этом соотношение экспрессии генов *Pomc* и *Agrp* в группе "ДИО" было в 1.7 раза выше, чем в контроле. В различной степени выраженное повышение экспрессии генов MCR, а также увеличение соотношения *Pomc*/*Agrp* может указывать на более выраженную стимуляцию анорексигенных каскадов в гипоталамусе мышей с ДИО. Эти изменения можно рассматривать как компенсаторную реакцию, направленную на снижение потребления животными высококалорийной пищи и, как следствие, на предотвращение развития у них тяжелой формы метаболического синдрома. Необходимо отметить, что данные литературы в отношении экспрессии генов *Mc3r*, *Mc4r*, *Pomc* и *Agrp* в гипоталамусе мышей с ДИО весьма противоречивы. Они демонстрируют, что изменение экспрессии этих генов во многом определяется составом и длительностью высококалорийной диеты, выраженностью и длительностью метаболических нарушений у животных, а также областью гипоталамуса, выбранной для изучения генной экспрессии [28–31]. Так, в гипоталамусе мышей через 8 недель ДИО, индуцированной потреблением насыщенных жиров, экспрессия генов, кодирующих POMC и AgRP, была снижена, в то время как экспрессия гена *Mc4R* не менялась, а через 16 недель ДИО экспрессия гена *Mc4r* повышалась, а экспрессия генов *Pomc* и *Agrp* нормализовалась [28]. Согласно другим авторам, длительная, 21-недельная, высокожировая диета приводила к существенному

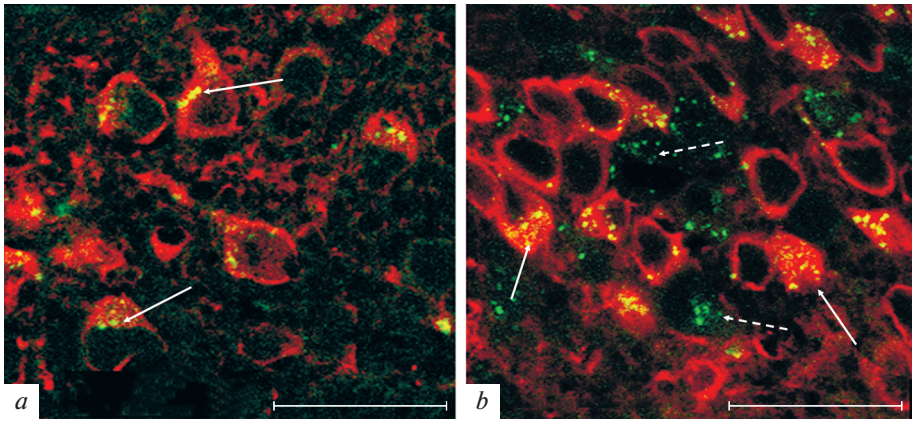


Рис. 2. Двойное флуоресцентное иммуномечение меланокортинового рецептора 1-го типа (MC1R) и про-опиомеланокортина (POMC) в аркуатном ядре гипоталамуса мышей контрольных (*a*) и с диета-индуцированным ожирением (*b*).
Микрофотографии демонстрируют иммуногистохимические реакции к MC1R (*зеленый*), POMC (*красный*) и их совмещение (*желтый*). Сплошные стрелки указывают на MC1R, локализованных в телах POMC-иммунопозитивных нейронов, прерывистые стрелки – вне POMC-нейронов. Масштаб 25 мкм.

повышению в гипоталамусе мышей с повышенной экспрессией лептинового рецептора как экспрессии гена *Pomc*, так и к повышению на 60% соотношения генов *Pomc* и *Agrp* [31].

При этом данные в отношении влияния ДИО на экспрессию MC1R в гипоталамусе и других отделах мозга отсутствуют. Это обусловлено как тем, что информация об экспрессии и локализации этого типа MCR в ЦНС фрагментарна [13, 14], так и отсутствием информации о возможной роли MC1R в гипоталамусе и других отделах мозга [14]. Так, у крыс экспрессия гена *Mc1r* в различных отделах мозга была показана только в 2021 г., причем в гипоталамусе уровень этой экспрессии был сравнительно низким и существенно уступал таковому в среднем мозге, мозжечке и гиппокампе и был сопоставимым с таковым во фронтальной коре [13]. Кроме того, мРНК для гена *Mc1r* была обнаружена в гипоталамусе морского окуня (*Epinephelus coioides*) [14]. При этом роль MC1R в ЦНС до сих пор не установлена, в отличие от хорошо изученной роли этого рецептора на периферии. Так, MC1R широко представлены во многих периферических органах и тканях, в коже и клетках крови [11, 32, 33], контролируют многие физиологические процессы, включая меланогенез [11] и липидный обмен [33, 34].

Нами с помощью молекулярно-биологических и иммуногистохимических методов MC1R не только идентифицированы в гипоталамусе, но и показано изменение уровня экспрессии кодирующего их гена, а также плотности этих рецепторов в нейронах аркуатного ядра гипоталамуса (рис. 2a). С помощью двойного флуоресцентного иммуномечения локализация MC1R выявлена в POMC-нейронах, а также показано увеличение уровня MC1R в них у ДИО-мышей (рис. 2b), что может указывать на тесную взаимосвязь между MC1R-опосредуемыми каскадами и продукцией POMC нейронами в аркуатных ядрах гипоталамуса. Это может быть обусловлено тем, что в гипоталамусе мышей с ДИО экспрессия генов *Mc1r* и *Pomc* повышается примерно в одинаковой степени. Взаимоотношения между MC1R и другими компонентами меланокортинового сигналинга в норме и при различных формах метаболических расстройств требуют дальнейших исследований.

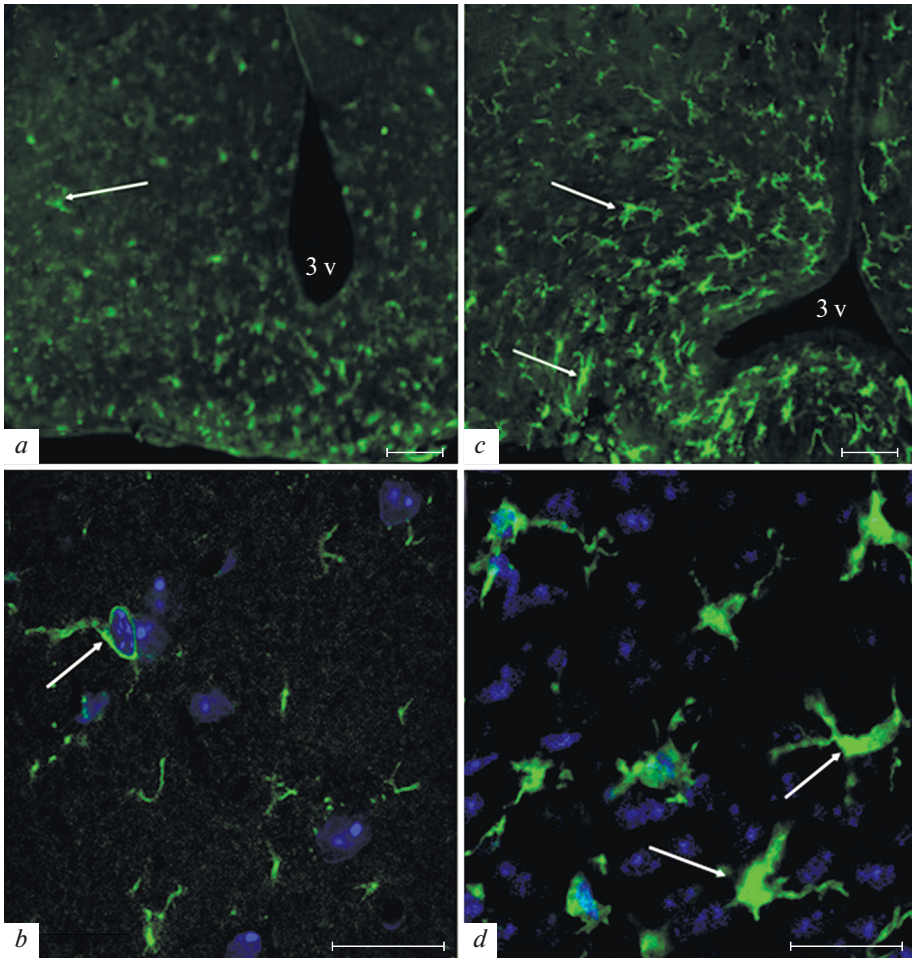


Рис. 3. Флуоресцентное иммуномечение IBA1, маркера микроглии, в аркуатном ядре гипоталамуса мышей контрольных (*a*, *b*) и с диета-индуцированным ожирением (*c*, *d*).
Микрофотографии демонстрируют иммуногистохимические реакции к IBA1 (*зеленый*) и ядерному красителю DAPI (*синий*). Стрелки указывают на тела IBA1-иммунопозитивных клеток, 3v – полость 3-го желудочка мозга. Масштаб 50 мкм (*a*, *c*) или 20 мкм (*b*, *d*).

Как на периферии, так и в ЦНС меланокортиновые пептиды и их рецепторы, включая MC1R, вовлечены в регуляцию воспалительных процессов [35–38]. Так, имеются сведения о том, что MC1R могут контролировать воспалительные процессы в клетках эндотелия сосудов мозга, глиальных клетках и нейронах и их выживаемость, что может свидетельствовать о тесной взаимосвязи между MC1R-опосредуемыми сигнальными каскадами и активностью провоспалительных и апоптотических путей в этих клетках [37, 39–41]. Показано, что противовоспалительные эффекты α-MSH, реализуемые в микроглии и нейронах через MC1R, направлены на ингибирование активности АМФ-активируемой киназы и зависимого от нее провоспалительного ядерного фактора-κB [39], на ослабление вовлеченного в регуляцию митохондриальной динамики и апоптоза сигнального пути, включающего

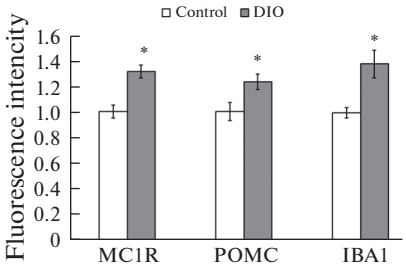


Рис. 4. Анализ интенсивности свечения меланокортиновых рецепторов 1-го типа (MC1R), про-опиомеланокортина (POMC) и связывающей ионизированный кальций адаптерной молекулы-1 (IBA1) в телах клеток, локализованных в аркуатных ядрах гипоталамуса у мышей контрольных (Control) и с диета-индуцированным ожирением (DIO); * – различия между группами “Control” и “DIO” статистически значимы при $p < 0.05$.

АМФ-активируемую протеинкиназу, сиртуин-1 и коактиватор-1α, активируемого пероксисомными активаторами рецептора-γ (PGC-1α) [40], а также на стимуляцию активности MC1R-зависимого цАМФ-зависимого каскада и зависимой от него экспрессии подавляющего воспаление ядерного рецептора Nurr1 [41].

С целью проверки возможных взаимосвязей между уровнем MC1R и интенсивностью воспалительных процессов в гипоталамусе мышей при ДИО, мы исследовали уровень экспрессии белка IBA1 – маркера микроглиального воспаления (рис. 3). Этот белок обладает специфическим кальций-связывающим и актин-связывающим действием, участвует в изменении формы плазматической мембраны, в процессах фагоцитоза и активации микроглии и периферических макрофагов [42].

Полученные нами данные демонстрируют в гипоталамусе ДИО-мышей, в частности в области аркуатных ядер, увеличение количества IBA1-иммунопозитивных клеток на 60% ($p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой; рис. 3a, c), увеличение размера их тела и утолщение отростков (рис. 3b, d), а также увеличение уровня IBA1 (на 38%, $p < 0.05$), о чем свидетельствует увеличение интенсивности свечения иммунопозитивного материала в них (рис. 4). При этом анализ POMC-иммунопозитивных нейронов аркуатных ядер демонстрирует у ДИО-мышей увеличение как уровня POMC (на 24%, $p < 0.05$), так и уровня MC1R (на 32%, $p < 0.05$) в них по сравнению с контрольными животными (рис. 4).

Повышение уровня IBA1 служит маркером активации микроглиальных клеток при патологических процессах в мозге, в том числе при активации процессов воспаления и апоптоза при ДИО [43], причем уровень IBA1 повышается даже при однодневной высокожировой диете [44]. Нами показано, что повышение экспрессии белка IBA1 в гипоталамусе ДИО мышей ассоциировано с повышением экспрессии MC1R. Это может свидетельствовать о том, что активация MC1R-сигнальных путей при метаболических расстройствах является одним из механизмов ослабления процессов воспаления, маркером которого является повышение экспрессии белка IBA1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами с помощью двойного флуоресцентного иммуномечения было показано, что в аркуатном ядре гипоталамуса мышей MC1R локализованы на POMC-иммунопозитивных нейронах, причем в условиях ДИО количество MC1R и POMC значительно возрастало. В гипоталамусе ДИО-мышей также повышались уровни мРНК для MC1R, MC3R и POMC, что указывает на активацию меланокортиновой

системы, вовлеченной в снижение аппетита при ДИО. В аркуатных ядрах гипоталамуса у ДИО мышей повышалось содержание маркера микроглиального воспаления – белка IBA1, что может свидетельствовать о взаимосвязи между MC1R-сигнальными каскадами и активностью воспалительных процессов в гипоталамусе в условиях ДИО. Таким образом, мы впервые показали, что MC1R экспрессируются в гипоталамусе и локализованы в POMC-иммунопозитивных нейронах в аркуатных ядрах гипоталамуса, их количество в гипоталамусе ДИО мышей увеличивается, и это может свидетельствовать об участии MC1R, подобно MC3R и MC4R, в регуляции периферического метаболизма. Кроме того, наши данные указывают на возможную взаимосвязь повышения экспрессии MC1R с усилением нейровоспаления при ДИО, о чем свидетельствует выявленное нами синхронное повышение содержания в гипоталамусе MC1R и маркера воспаления IBA1.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН в рамках государственного задания № 075-0152-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента (И.В.Р., А.О.Ш.), проведение экспериментов и сбор материала для исследования (Е.В.М., И.В.Р.), проведение исследований (Е.В.М., К.В.Д., И.В.Р.), обработка результатов (Е.В.М., К.В.Д., И.В.Р.), написание и редактирование текста (А.О.Ш., И.В.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cone RD* (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. Endocr Rev 7: 736–749.
https://doi.org/10.1210/er.2006-0034
2. *Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM* (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. Future Sci OA 1(3): FSO25.
https://doi.org/10.4155/fso.15.23
3. *Baldini G, Phelan KD* (2019) The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. J Endocrinol 241(1): R1–R33.
https://doi.org/10.1530/JOE-18-0596
4. *Micioni Di Bonaventura E, Botticelli L, Tomassoni D, Tayebati SK, Micioni Di, Bonaventura MV, Cifani C* (2020) The Melanocortin System behind the Dysfunctional Eating Behaviors. Nutrients 12(11): 3502.
https://doi.org/10.3390/nu12113502
5. *Zhou Y, Cai M* (2017) Novel approaches to the design of bioavailable melanotropins. Expert Opin Drug Discov 12(10): 1023–1030.
https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1351940
6. *Lindberg I, Fricker LD* (2021) Obesity, POMC, and POMC-processing Enzymes: Surprising Results From Animal Models. Endocrinology 162(12): bqab155.
https://doi.org/10.1210/endocr/bqab155
7. *Rodrigues AR, Almeida H, Gouveia AM* (2015) Intracellular signaling mechanisms of the melanocortin receptors: current state of the art. Cell Mol Life Sci 72(7): 1331–1345.
https://doi.org/10.1007/s00018-014-1800-3
8. *Li YQ, Shrestha Y, Pandey M, Chen M, Kablan A, Gavrilova O, Offermanns S, Weinstein LS* (2016) G(q/11)α and G(s)α mediate distinct physiological responses to central melanocortins. J Clin Invest 126(1): 40–49.
https://doi.org/10.1172/JCI76348

9. *Mountjoy KG* (2010) Distribution and function of melanocortin receptors within the brain. Adv Exp Med Biol 681: 29–48.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6354-3_3
10. *Zhang J, Li X, Zhou Y, Cui L, Li J, Wu C, Wan Y, Li J, Wang Y* (2017) The interaction of MC3R and MC4R with MRAP2, ACTH, α-MSH and AgRP in chickens. J Endocrinol 234(2): 155–174.
https://doi.org/10.1530/JOE-17-0131
11. *Rosenkranz AA, Slastnikova TA, Durymanov MO, Sobolev AS* (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor. Biochemistry (Mosc) 78(11): 1228–1237.
https://doi.org/10.1134/S0006297913110035
12. *Chen X, Chen H, Cai W, Maguire M, Ya B, Zuo F, Logan R, Li H, Robinson K, Vanderburg CR, Yu Y, Wang Y, Fisher DE, Schwarzschild MA* (2017) The melanoma-linked "redhead" MC1R influences dopaminergic neuron survival. Ann Neurol 81(3): 395–406.
https://doi.org/10.1002/ana.24852
13. *Zhou Y, Chawla MK, Rios-Monterrosa JL, Wang L, Zempare MA, Hruby VJ, Barnes CA, Cai M* (2021) Aged Brains Express Less Melanocortin Receptors, Which Correlates with Age-Related Decline of Cognitive Functions. Molecules 26(20): 6266.
https://doi.org/10.3390/molecules26206266
14. *Ji LQ, Rao YZ, Zhang Y, Chen R, Tao YX* (2020) Regulation of melanocortin-1 receptor pharmacology by melanocortin receptor accessory protein 2 in orange-spotted grouper (Epinephelus coioides). Gen Comp Endocrinol 285: 113291.
https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113291
15. *Ayers KL, Glicksberg BS, Garfield AS, Longerich S, White JA, Yang P, Du L, Chittenden TW, Gulcher JR, Roy S, Fiedorek F, Gottesdiener K, Cohen S, North KE, Schadt EE, Li SD, Chen R, Van der Ploeg LHT* (2018) Melanocortin 4 Receptor Pathway Dysfunction in Obesity: Patient Stratification Aimed at MC4R Agonist Treatment. J Clin Endocrinol Metab 103(7): 2601–2612.
https://doi.org/10.1210/jc.2018-00258
16. *Yeo GSH, Chao DHM, Siegert AM, Koerperich ZM, Ericson MD, Simonds SE, Larson CM, Luquet S, Clarke I, Sharma S, Clément K, Cowley MA, Haskell-Luevano C, Van Der Ploeg L, Adan RAH* (2021) The melanocortin pathway and energy homeostasis: From discovery to obesity therapy. Mol Metab 48: 101206.
https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101206
17. *Romanova IV, Derkach KV, Mikhrina AL, Sukhov IB, Mikhailova EV, Shpakov AO* (2018) The Leptin, Dopamine and Serotonin Receptors in Hypothalamic POMC-Neurons of Normal and Obese Rodents. Neurochem Res 43(4): 821–837.
https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z
18. *Derkach KV, Bondareva VM, Chistyakova OV, Berstein LM, Shpakov AO* (2015) The Effect of Long-Term Intranasal Serotonin Treatment on Metabolic Parameters and Hormonal Signaling in Rats with High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes. Int J Endocrinol 2015: 245459.
https://doi.org/10.1155/2015/245459
19. *Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtyukov A, Romanova I, Bayunova L, Shpakov A* (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. PLoS One 14(3): e0213779.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779
20. *Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S* (2000) Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. J Cell Sci 113 (Pt 17): 3073–3084.
https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3073
21. *Gao Y, Ottaway N, Schriever SC, Legutko B, García-Cáceres C, de la Fuente E, Mergen C, Bour S, Thaler JP, Seeley RJ, Filosa J, Stern JE, Perez-Tilve D, Schwartz MW, Tschöp MH, Yi CX* (2014) Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. Glia 62(1): 17–25.
https://doi.org/10.1002/glia.22580
22. *Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD* (2016) Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. Psychopharmacology (Berl) 233(9): 1637–1650.
https://doi.org/10.1007/s00213-016-4218-9
23. *Romanova IV, Mikhailova EV, Shpakov AO* (2019) Immunochemical Identification of Melanocortin and Leptin Receptors on Serotoninergic Neurons in the Rat Midbrain. Neurosci Behav Physiol 49 (7): 832–837.
https://doi.org/10.1007/s11055-019-00809-w
24. *Paxinos G, Franklin KBJ* (2019) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. Hardcover.
25. *Maioli TU, Gonçalves JL, Miranda MC, Martins VD, Horta LS, Moreira TG, Godard AL, Santiago AF, Faria AM* (2016) High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. Inflamm Res 65(2): 169–178.
https://doi.org/10.1007/s00011-015-0902-1

26. *Murtaza M, Khan G, Aftab MF, Afridi SK, Ghaffar S, Ahmed A, Hafizur RM, Waraich RS* (2017) Cucurbitacin E reduces obesity and related metabolic dysfunction in mice by targeting JAK-STAT5 signaling pathway. PLoS One 12(6): e0178910.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178910
27. *Pretz D, Le Foll C, Rizwan MZ, Lutz TA, Tups A* (2021) Hyperleptinemia as a contributing factor for the impairment of glucose intolerance in obesity. FASEB J 35(2): e21216.
https://doi.org/10.1096/fj.202001147R
28. *Huang XF, Han M, South T, Storlien L* (2003) Altered levels of POMC, AgRP and MC4R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. Brain Res 992(1): 9–19.
https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.08.019
29. *Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nillni EA, Grove KL, Cowley MA* (2007) Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. Cell Metab 5(3): 181–194.
https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.02.004
30. *Gout J, Sarafian D, Tirard J, Blondet A, Vigier M, Rajas F, Mithieux G, Begeot M, Naville D* (2008) Leptin infusion and obesity in mouse cause alterations in the hypothalamic melanocortin system. Obesity (Silver Spring) 16(8): 1763–1769.
https://doi.org/10.1038/oby.2008.303
31. *Gamber KM, Huo L, Ha S, Hairston JE, Greeley S, Bjørbæk C* (2012) Over-expression of leptin receptors in hypothalamic POMC neurons increases susceptibility to diet-induced obesity. PLoS One 2012;7(1): e30485.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030485
32. *Salazar-Onfray F, López M, Lundqvist A, Aguirre A, Escobar A, Serrano A, Korenblit C, Petersson M, Chhajlani V, Larsson O, Kiessling R* (2002) Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. Br J Cancer 87(4): 414–422.
https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600441
33. *Rinne P, Rami M, Nuutinen S, Santovito D, van der Vorst EPC, Guillamat-Prats R, Lyytikäinen LP, Raitoharju E, Oksala N, Ring L, Cai M, Hruby VJ, Lehtimäki T, Weber C, Steffens S* (2017) Melanocortin 1 Receptor Signaling Regulates Cholesterol Transport in Macrophages. Circulation 136(1): 83–97.
https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025889
34. *Kadiri JJ, Tadayon S, Thapa K, Suominen A, Hollmén M, Rinne P* (2021) Melanocortin 1 Receptor Deficiency in Hematopoietic Cells Promotes the Expansion of Inflammatory Leukocytes in Atherosclerotic Mice. Front Immunol 12: 774013.
https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.774013
35. *Mioni C, Giuliani D, Cainazzo MM, Leone S, Bazzani C, Grieco P, Novellino E, Tomasi A, Bertolini A, Guarini S* (2003) Further evidence that melanocortins prevent myocardial reperfusion injury by activating melanocortin MC3 receptors. Eur J Pharmacol 477(3): 227–234.
https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)02184-8
36. *Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S* (2010) The melanocortin system in control of inflammation. Scient World J 14 (10): 1840–1853. PMCID: PMC5763663
https://doi.org/10.1100/tsw.2010.17320852827
37. *Wang W, Guo DY, Lin YJ, Tao YX* (2019) Melanocortin Regulation of Inflammation. Front Endocrinol (Lausanne) 10: 683.
https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00683
38. *Fu C, Chen J, Lu J, Yi L, Tong X, Kang L, Pei S, Ouyang Y, Jiang L, Ding Y, Zhao X, Li S, Yang Y, Huang J, Zeng Q* (2020) Roles of inflammation factors in melanogenesis (Review). Mol Med Rep 21(3): 1421–1430.
https://doi.org/10.3892/mmr.2020.10950
39. *Xu W, Mo J, Ocak U, Travis ZD, Enkhjargal B, Zhang T, Wu P, Peng J, Li T, Zuo Y, Shao A, Tang J, Zhang J, Zhang JH* (2020) Activation of Melanocortin 1 Receptor Attenuates Early Brain Injury in a Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage viathe Suppression of Neuroinflammation through AMPK/TBK1/NF-κB Pathway in Rats. Neurotherapeutics 17(1): 294–308.
https://doi.org/10.1007/s13311-019-00772-x
40. *Xu W, Yan J, Ocak U, Lenahan C, Shao A, Tang J, Zhang J, Zhang JH* (2021) Melanocortin 1 receptor attenuates early brain injury following subarachnoid hemorrhage by controlling mitochondrial metabolism *via* AMPK/SIRT1/PGC-1α pathway in rats. Theranostics 11(2): 522–539.
https://doi.org/10.7150/thno.49426
41. *Yu S, Doycheva DM, Gamdzyk M, Gao Y, Guo Y, Travis ZD, Tang J, Chen WX, Zhang JH* (2022) BMS-470539 Attenuates Oxidative Stress and Neuronal Apoptosis via MC1R/cAMP/PKA/Nurr1 Signaling Pathway in a Neonatal Hypoxic-Ischemic Rat Model. Oxid Med Cell Longev 2022: 4054938.
https://doi.org/10.1155/2022/4054938

42. *Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S* (2004) Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. J Neurochem 88(4): 844–856. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x
43. *Leyh J, Winter K, Reinicke M, Ceglarek U, Bechmann I, Landmann J* (2021) Long-term diet-induced obesity does not lead to learning and memory impairment in adult mice. PLoS One 16(9): e0257921. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257921
44. *Waise TMZ, Toshinai K, Naznin F, NamKoong C, Md Moin AS, Sakoda H, Nakazato M* (2015) One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. Biochem Biophys Res Commun 464(4): 1157–1162. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.097

Melanocortin 1 Receptors in the Hypothalamus of Mice within the Norm and in Diet-Induced Obesity

E. V. Mikhailova[a], K. V. Derkach[a], A. O. Shpakov[a], and I. V. Romanova[a, *]

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

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

The hypothalamic melanocortin system plays a key role in the regulation of eating behavior and peripheral metabolism, and its activity changes significantly in metabolic disorders. However, the possible role of the melanocortin 1 receptor (MC1R) in these processes remains unclear, while the data on the expression and localization of the MC1R in the hypothalamus of vertebrates are quite fragmentary. The aim of this work was to study the expression and distribution of MC1Rs in the hypothalamus of control mice and those with diet-induced obesity (DIO) as compared to the expression of other components of the melanocortin system and the hypothalamic localization of the microglial inflammatory (microgliosis) marker protein IBA1. DIO was induced in female C57Bl/6J mice by a 16-week diet enriched in light carbohydrates and saturated fats, which also led to impaired glucose tolerance, hyperleptinemia and hyperinsulinemia. Double fluorescent immunolabeling localized MC1Rs to pro-opiomelanocortin (POMC)-immunopositive neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. In DIO, the amount of MC1Rs and POMC in hypothalamic neurons increased significantly. In addition, mRNA levels of MC1R, MC3R and POMC increased in the hypothalamus of DIO mice, indicative of an increase in the expression of the main melanocortin system's components in DIO. In the hypothalamic arcuate nuclei of DIO mice, the IBA1 level, as estimated by the intensity of immunohistochemical labeling, was also elevated, suggesting a relationship between MC1R signaling cascades and the activity of inflammatory processes in the hypothalamus under DIO conditions. Thus, we have shown for the first time the expression of MC1Rs and their localization on POMC-immunopositive neurons of the hypothalamic arcuate nuclei, as well as their increase in DIO and a possible relationship with the hypothalamic expression of POMC and IBA1. These findings may indicate the role of the MC1R as a potential regulator of peripheral metabolism and neuroinflammation under normal conditions and in metabolic disorders.

Keywords: melanocortin type 1 receptor, pro-opiomelanocortin, diet-induced obesity, hypothalamus, neuroinflammation

EDN: FYSKNB
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 8, с. 1028–1041

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ МЕТФОРМИНА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА У САМЦОВ КРЫС С ОГРАНИЧЕНИЕМ ГРУДНОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ

© 2022 г.
К. В. Деркач[1], *, В. М. Бондарева[1], Т. С. Шарова[1], А. О. Шпаков[1]

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

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

Поступила в редакцию 02.06.2022 г.
После доработки 30.06.2022 г.
Принята к публикации 04.07.2022 г.

Ограничение грудного вскармливания в раннем онтогенезе (Early Weaned, EW) приводит к метаболическим нарушениям в зрелом возрасте, являясь одной из причин метаболического синдрома (МС). Однако спектр гормональных нарушений при EW изучен в недостаточной степени, а подходы для его коррекции не разработаны. Целью работы было изучить метаболические и гормональные изменения, включая гормональный статус гонадной и тиреоидной осей, у 10-месячных самцов крыс, которые в раннем постнатальном периоде были лишены грудного вскармливания, а также исследовать восстанавливающий эффект на эти изменения четырехнедельного лечения с помощью различных доз метформина (МФ) – средней (120 мг/кг/сутки) и сравнительно высокой (250 мг/кг/сутки). Лактацию у кормящих самок крыс прерывали с помощью бромокриптина (10 мг/кг/сутки) на 19–21-й дни лактации. Крысят после вынужденного голодания в этот период переводили на стандартный корм. В возрасте 10 месяцев самцы крыс группы EW имели характерные признаки МС, такие как ожирение, нарушенная толерантность к глюкозе, инсулинорезистентность, гиперлептинемия, дислипидемия. У них были снижены уровни тестостерона, лютеинизирующего гормона (ЛГ) и тиреоидных гормонов и повышен уровень тиреотропного гормона (ТТГ). Четырехнедельное лечение МФ взрослых крыс в средней дозе снижало массу тела и жира, частично восстанавливало метаболические показатели, в полной мере нормализовало уровни тестостерона, ЛГ, тироксина, трийодтиронина и ТТГ. Лечение МФ в относительно высокой дозе более эффективно восстанавливало метаболические показатели, нормализовало уровни лептина и инсулина, но слабо влияло на уровни гормонов гонадной и тиреоидной осей. Таким образом, длительное лечение самцов крыс группы EW с помощью средних доз МФ улучшает метаболические показатели и полностью восстанавливает гормональный статус гонадной и тиреоидной осей, что указывает на перспективность использования таких доз для коррекции МС и эндокринных дисфункций, вызванных нарушением грудного вскармливания.

Ключевые слова: метаболический синдром, раннее отлучение от груди, потомство, гиперлептинемия, тиреотропный гормон, тиреоидный гормон, андрогенный дефицит

DOI: 10.31857/S0869813922080015

Бигуанид метформин (МФ), препарат первой линии выбора при лечении сахарного диабета 2-го типа [1–4], широко применяется для нормализации метаболических и гормональных показателей и при ряде других заболеваний, среди которых метаболический синдром (МС), атеросклероз, поликистоз яичников, старческая деменция, онкологические заболевания [5–7]. Значительные перспективы имеет применение МФ для восстановления функций эндокринной системы, в том числе не связанных с развитием диабета [8–11]. Известно, что нарушение грудного вскармливания и голодание в раннем постнатальном периоде приводят к метаболическим и гормональным нарушениям в зрелом возрасте [12]. Моделирование таких состояний у крыс показывает, что в результате острого дефицита грудного вскармливания в дальнейшем, в возрасте трех и более месяцев, у них начинают выявляться такие признаки МС, как нарушение толерантности к глюкозе, изменения липидного и углеводного метаболизма [13–17]. Поскольку основным механизмом терапевтического воздействия МФ является восстановление чувствительности тканей к инсулину, снижение всасывания глюкозы в желудочно-кишечном тракте и нормализация метаболизма, то имеются основания полагать, что МФ-терапия способна улучшить метаболические и гормональные показатели при МС-подобном состоянии, которое запрограммировано дефицитом пищевых ресурсов, в первую очередь, ограничением потребления грудного молока в раннем онтогенезе. В соответствии с этим одной из задач данного исследования было проверить это предположение.

Имеются данные, что следствием ограничения грудного вскармливания являются нарушения со стороны эндокринной системы, но эти данные немногочисленны и противоречивы [16, 18–20]. Так, показано, что снижение потребляемого крысятами грудного молока вследствие избыточного их числа в помете (20 крысят) в зрелом возрасте приводит к андрогенной недостаточности [18]. Вызываемое различными способами ограничение грудного вскармливания приводит к развитию у взрослых животных дефицита тиреоидных гормонов, в первую очередь тироксина, что указывает на ослабление функций щитовидной железы [19, 20]. При этом данные о влиянии фармакологических препаратов на функции эндокринной системы у крыс с дефицитом грудного вскармливания отсутствуют. Обнаружение гормональных изменений в гонадной и тиреоидной осях и оценка влияния на них МФ были другими задачами нашего исследования.

В соответствии с вышесказанным, целью работы было исследовать метаболические и гормональные изменения, в том числе гормональный статус гонадной и тиреоидной осей, у 10-месячных самцов крыс с ограничением грудного вскармливания, вызванным обработкой кормящих самок бромокриптином, а также оценить восстанавливающее влияние на эти показатели четырехнедельного лечения МФ. Поскольку при различных метаболических и эндокринных заболеваниях используют различные дозы МФ, то нами были изучены средняя доза (120 мг/кг/сутки), обычно используемая для коррекции ожирения и МС у крыс, и более высокая доза препарата (250 мг/кг/сутки), применяемая, как правило, при более тяжелых расстройствах, в первую очередь при сахарном диабете 2-го типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для экспериментов были использованы крысы линии Вистар, которых содержали в стандартных условиях вивария, при свободном доступе к корму и воде. Все процедуры по уходу за животными и их использованию для создания, характеристики и изучения модели МС осуществляли в строгом соответствии с требованиями Этического комитета Института эволюционной физиологии и биохимии

им. И.М. Сеченова РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Для опытов использовались самцы крыс Вистар, которые в раннем онтогенезе испытали дефицит грудного вскармливания и возраст которых в начале эксперимента составил 9 мес. В неонатальный период число крысят в помете составило от 8 до 10 животных, чтобы в контрольной группе результаты не зависели от возможного дефицита грудного вскармливания, характерного для больших пометов. Взрослых самцов крыс содержали по 6 животных в пластиковом контейнере с неограниченным доступом к питьевой воде и стандартному сухому корму.

Модель ограничения грудного вскармливания, называемую также моделью “раннего отлучения от груди” (Early Weaned, EW), индуцировали вследствие прекращения лактации у кормящих самок на 19–21-й дни постнатального развития (P19–P21), согласно методу [13] с некоторыми модификациями. Для этого кормящим самкам дважды в день перорально (через зонд) вводили суспензию бромокриптин-мезилата в суточной дозе 10 мг/крысу (“Gedeon Richter, Plc.”, Венгрия). В течение трех дней (P19–P21) крысята не имели доступа к пище, начиная с дня P22 их переводили на стандартный сухой корм. Самцы-крысята, которые были в пометах того же размера, но получали полноценное грудное вскармливание, в дальнейшем служили контролем. Кормящие их самки в те же сроки и в том же объеме вместо суспензии бромокриптина получали физиологический раствор. После отъема от самок, самцов-крысят одного и того же возраста случайным образом распределяли в разные контейнеры.

В возрасте 6 месяцев у самцов-крыс группы EW были отмечены значимое повышение массы тела и повышенный уровень постпрандиальной глюкозы (через 2 ч после потребления пищи), что указывало на развитие МС. В возрасте 9 мес., перед началом МФ-терапии, у животных оценивали массу тела и уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки (2 г/кг массы тела), и на основании полученных данных отбирали крыс с явными признаками ожирения (масса тела более 400 г) и нарушенной толерантностью к глюкозе (уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки выше 6.5 мМ). Отобранных животных (36 крыс) с EW рандомизировали на 3 группы (в каждой $n = 12$): интактные самцы крыс с ограничением грудного вскармливания в раннем онтогенезе, которые вместо МФ в течение 4 недель через зонд получали физиологический раствор (группа EW), EW-крысы, которые на протяжении 4 нед. получали лечение МФ (перорально, через зонд) в двух дозах – 120 мг/кг/сутки (группа EW-МФ120) и 250 мг/кг/сутки (группа EW-МФ250). В качестве контроля использовали самцов крыс того же возраста, которые полноценно питались в раннем онтогенезе (группа К, $n = 12$).

За неделю до окончания лечения МФ у половины крыс в каждой группе ($n = 6$) проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ), у другой половины – инсулиноглюкозотолерантный тест (ИГТТ). При проведении ГТТ крысам вводили глюкозу (2 г/кг, в/б), в то время как в случае ИГТТ животные одновременно получали глюкозу (2 г/кг, в/б) и инсулин “Humalog” (Eli Lilly, Швейцария) в дозе 0.8 МЕ/крысу (п/к). Перед введением и через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после него измеряли уровни глюкозы в крови, для чего использовали тест-полоски “One Touch Select” (США) и глюкометр (Life Scan Johnson & Johnson, Дания). До и через 120 мин после введения глюкозы в ГТТ и ИГТТ из хвостовой вены забирали образцы крови для определения концентрации инсулина, используя местный наркоз (2–4 мг лидокаина/крысу). Концентрацию инсулина измеряли с помощью ИФА-набора “Rat Insulin ELISA” (Mercodia, Швеция). До введения глюкозы оценивали уровень свободных жирных кислот, для чего использовали набор “NEFA FS kit” (DiaSys, Германия). Через 2 и 4 нед. после начала лечения МФ у животных забирали кровь для определения концентраций свободного тироксина (fT4), общего тироксина (tT4), свободного трийодтиронина (fT3) и

общего трийодтиронина (tT3), тестостерона. Уровни тиреоидных гормонов оценивали с помощью наборов фирмы “Иммунотех” (Россия), тестостерона – с помощью набора фирмы “АлкорБио” (Россия).

В конце эксперимента крыс наркотизировали хлоральгидратом (400 мг/кг, в/б), декапитировали, оценивали у них содержание абдоминального и эпидидимального жира и определяли уровни гормонов и метаболитов в крови. Для измерения уровней лептина, лютеинизирующего (ЛГ) и тиреотропного гормонов (ТТГ) и гликированного гемоглобина (HbA1c) использовали наборы “ELISA for Leptin, Rat”, “ELISA for LH, Rat” (Cloud-Clone Corp., США), “Rat Thyroid Stimulating Hormone ELISA” (Cusabio Biotech Co., Китай) и “Multi Test HbA1c System kit” (Polymer Technology Systems, Inc., США). Для измерения уровней триглицеридов и общего холестерина использовали тест-полоски “Triglycerides multiCare-in” и “Cholesterol multiCare-in” (Biochemical Systems Int., Италия). Индекс инсулиновой резистентности (ИР) рассчитывали как произведение концентраций глюкозы и инсулина в крови и представляли в виде условных единиц.

Для статистического анализа данных применяли пакет программ Microsoft Office Excel 2007, результаты представляли как среднее ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали t-критерий Стьюдента, для сравнения 3 или 4 групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взрослые, 10-месячные крысы с лишением грудного вскармливания в период P19–P21 имели повышение массы тела, абдоминального и эпидидимального жира и доли жировой ткани, что указывает на явные признаки ожирения, а также повышенные уровни триглицеридов и общего холестерина, это свидетельствует о нарушении липидного обмена (табл. 1). Отмечали тенденцию к повышению уровня свободных жирных кислот, но различия с контролем не были статистически значимыми ($p > 0.05$). Несмотря на отсутствие между группами K и EW значимых различий в уровне глюкозы натощак и содержания HbA1c в крови (табл. 1), при проведении ГТТ и ИГТТ уровни глюкозы в группе EW в различные временные точки, в том числе через 120 мин после глюкозной нагрузки, были выше, чем в контроле (рис. 1). Это иллюстрируют и более высокие значения AUC_{0-120} для ГТТ и ИГТТ в группе EW в сравнении с контролем (табл. 1).

Уровни инсулина через 120 мин после введения глюкозы и значения индекса ИР, как базовые, так и после глюкозной нагрузки, значимо превышали таковые в контроле (рис. 2).

Четырехнедельное лечение МФ в обеих исследованных дозах улучшало метаболические показатели, но в более высокой дозе препарат был эффективнее. Так, в группе EW-МФ250 отмечали достоверное снижение в сравнении с группой EW массы тела и жира, триглицеридов, холестерина, HbA1c, глюкозы, значений AUC_{0-120} для ГТТ и ИГТТ, индекса ИР, а также уровня инсулина после глюкозной нагрузки (табл. 1, рис. 1, 2). В группе EW-МФ120 значимо, в сравнении с группой EW, снижались только индекс ИР, концентрации глюкозы и инсулина через 120 мин после глюкозной нагрузки, значение AUC_{0-120} для глюкозной кривой в ГТТ и содержание HbA1c (табл. 1, рис. 1, 2). Следует отметить, что в группе EW-МФ120 масса тела и абдоминального жира, концентрация холестерина в крови и значение AUC_{0-120} для глюкозной кривой в ИГТТ, хотя и не отличались от группы EW, но не отлича-

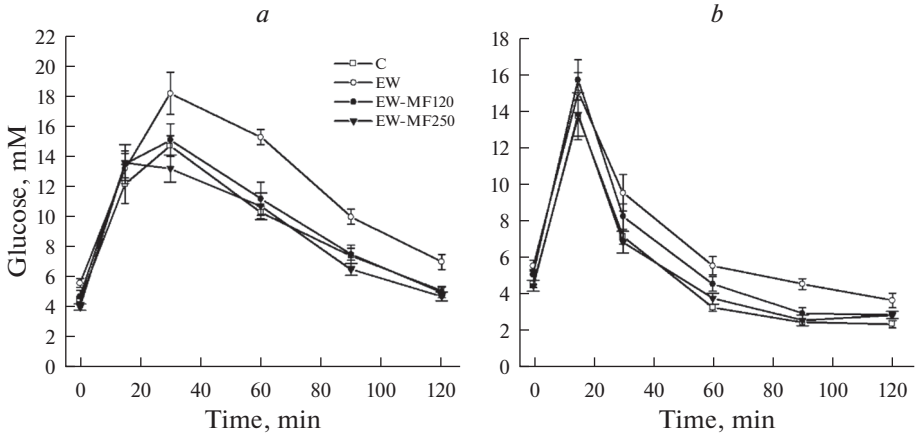


Рис. 1. Концентрация глюкозы в крови крыс с ограничением грудного вскармливания при проведении глюкозотолерантного (*a*) и инсулиноглюкозотолерантного (*b*) тестов и влияние на утилизацию глюкозы четырехнедельной терапии метформином в дозах 120 и 250 мг/кг/сутки.
Обозначения групп – К (C), EW, EW-МФ120 (EW-MF120), EW-МФ250 (EW-MF250). $M \pm SEM$, $n = 6$.

лись и от контроля, что указывает на их частичное восстановление средними дозами МФ (табл. 1).

В отличие от инсулина, базовый уровень которого в группе EW не отличался от контрольных значений, уровни других изученных полипептидных гормонов у EW-крыс значимо менялись. В группе EW концентрации лептина и ТТГ повышались, а концентрация ЛГ снижалась (табл. 2). Средние дозы МФ полностью восстанавливали

Таблица 1. Масса тела и жировой ткани, липидный статус и глюкозный гомеостаз у самцов крыс Вистар с ранним отлучением от груди (EW, Early Weaned) и влияние на них четырехнедельной терапии метформином в суточных дозах 120 и 250 мг/кг

Показатель	К	EW	EW-МФ120	EW-МФ250
Масса тела, г	394 ± 9	453 ± 11[a]	419 ± 11	401 ± 14[b]
Масса АЖ, г	6.6 ± 0.3	10.0 ± 0.7[a]	7.8 ± 0.7	6.8 ± 0.5[b]
Масса ЭЖ, г	3.9 ± 0.2	5.6 ± 0.4[a]	4.9 ± 0.3 [a]	4.4 ± 0.3[b]
Доля жира, %	2.7 ± 0.1	3.4 ± 0.2[a]	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.1[b]
ТГ, мМ	2.07 ± 0.15	3.31 ± 0.24[a]	2.79 ± 0.17 [a]	2.12 ± 0.14[b, c]
ОХ, мМ	4.40 ± 0.14	5.32 ± 0.28[a]	4.78 ± 0.17	4.29 ± 0.18[b]
СЖК, мМ	3.79 ± 0.15	4.60 ± 0.39	4.16 ± 0.22	4.03 ± 0.19
Глюкоза, мМ	4.27 ± 0.13	5.09 ± 0.31	4.49 ± 0.15	4.01 ± 0.17[b]
HbA1c, %	4.38 ± 0.16	5.57 ± 0.34	4.47 ± 0.19 [b]	4.26 ± 0.15[b]
AUC_{0-120}, ГТТ*	1151 ± 35	1513 ± 39[a]	1212 ± 62 [b]	1116 ± 62[b]
AUC_{0-120}, ИГТТ*	611 ± 31	844 ± 59[a]	732 ± 46	630 ± 52[b]

АЖ и ЭЖ – абдоминальный и эпидидимальный жир, ТГ – триглицериды, ОХ – общий холестерин, СЖК – свободные жирные кислоты, AUC_{0-120} (ГТТ) и AUC_{0-120} (ИГТТ) – площади под кривыми "концентрация глюкозы, мМ – время, мин" (в условных единицах) в глюкозотолерантном и инсулиноглюкозотолерантном тестах. Различия с группой К ([a]), между группой EW и группами, обработанными метформином ([b]) и между группами EW-МФ120 и EW-МФ250 ([c]) статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, $n = 12$. * – при проведении ГГТ и ИГТТ число животных $n = 6$.

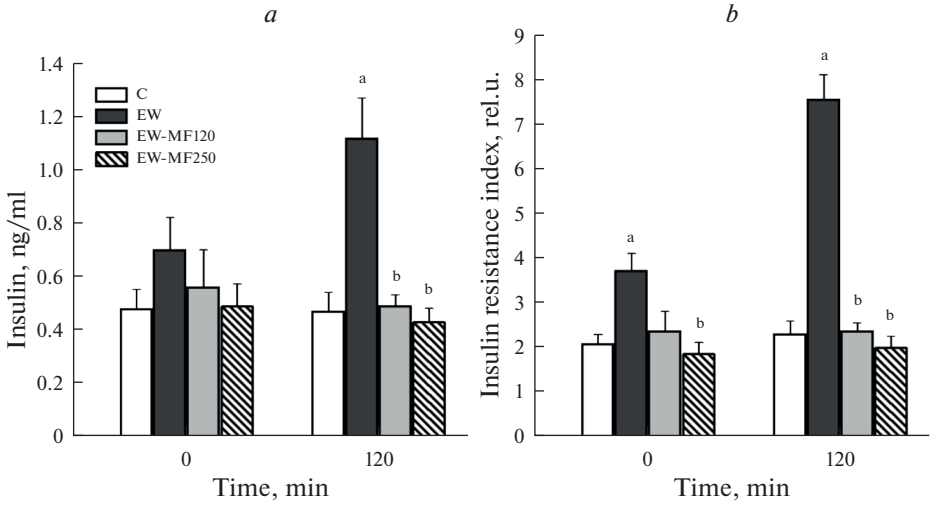


Рис. 2. Уровни инсулина в крови (*a*) и рассчитанные значения индекса инсулиновой резистентности (*b*) у взрослых крыс с ограничением грудного вскармливания до (0 мин) и через 120 мин после нагрузки глюкозой в глюкозотолерантном тесте и влияние на них четырехнедельной терапии различными дозами метформина.

Различия с группой К ([a]) и между группой EW и группами, обработанными метформином ([b]), статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, $n = 6$.

Обозначения групп: К (C), EW, EW-МФ120 (EW-MF120), EW-МФ250 (EW-MF250).

уровни ЛГ и ТТГ, но слабо влияли на уровень лептина, который оставался повышенным, в то время как высокие дозы МФ нормализовали уровень лептина, но при этом в незначительной степени влияли на уровни обоих гипофизарных гормонов. Так в группе EW-МФ250 концентрация ТТГ была выше по сравнению с контролем и группой EW-МФ120, но не отличалась от группы EW (табл. 2).

Уровни тиреоидных гормонов и тестостерона у самцов крыс группы EW были снижены, что свидетельствует о нарушении функций тиреоидной и гонадной осей (рис. 3, 4). Двухнедельная обработка крыс группы EW обеими дозами МФ полностью восстанавливала тиреоидный и андрогенный статус, причем во всех случаях различия с группой EW были значимыми (рис. 3, 4). Однако более продолжительное лечение МФ вызывало дифференцированный ответ эндокринной системы EW-крыс на различные дозы препарата. При использовании средних доз восстанавливающий эффект МФ сохранялся, в то время как при использовании дозы 250 мг/кг он ослабевал или, как это показано для tT3 и тестостерона, полностью

Таблица 2. Уровни гормонов у 10-месячных самцов крыс с ограничением грудного вскармливания и влияние на них четырехнедельной терапии различными дозами метформина

Показатель	К	EW	EW-МФ120	EW-МФ250
Лептин, нг/мл	0.93 ± 0.10	1.81 ± 0.16^{a}	1.37 ± 0.13^{a}	1.03 ± 0.11^{b}
ЛГ, нг/мл	1.98 ± 0.16	1.39 ± 0.12^{a}	2.03 ± 0.16^{b}	1.47 ± 0.14^{c}
ТТГ, мкЕД/мл	0.52 ± 0.06	1.43 ± 0.15^{a}	0.54 ± 0.09^{b}	$0.98 \pm 0.12^{a, c}$

Различия с группой К ([a]), между группой EW и группами, обработанными метформином ([b]) и между группами EW-МФ120 и EW-МФ250 ([c]) статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, $n = 12$.

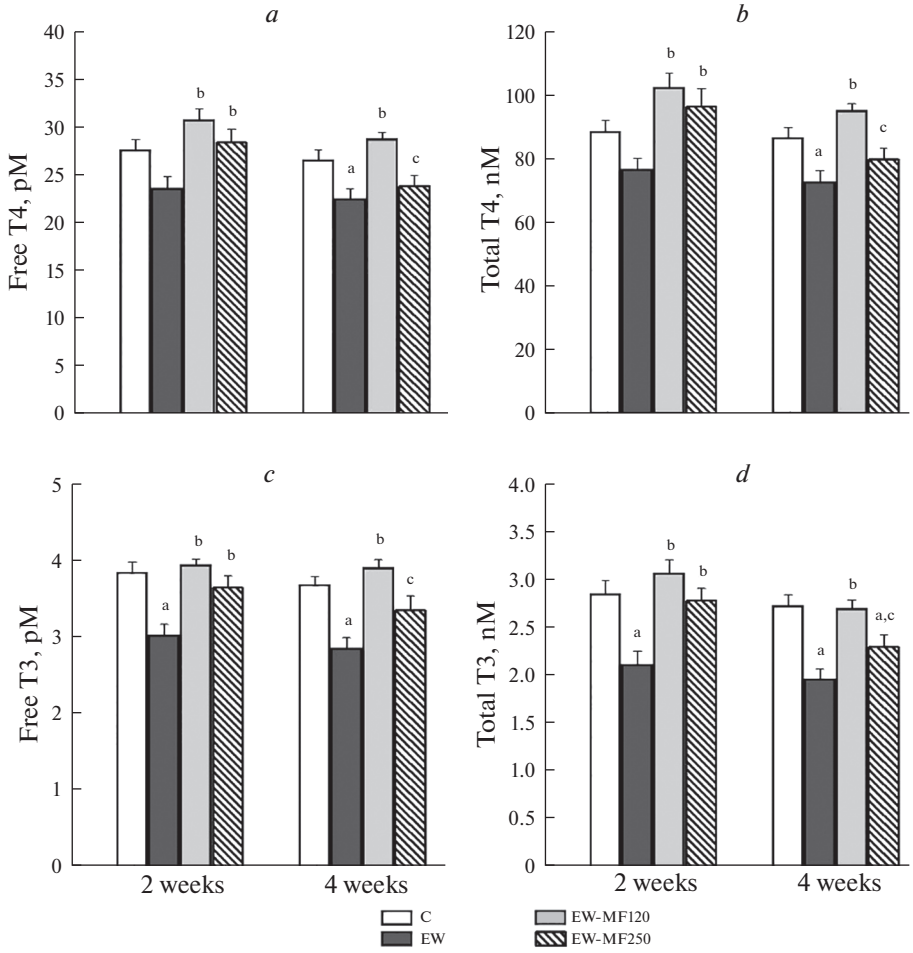


Рис. 3. Уровни тиреоидных гормонов в крови 10-месячных самцов крыс с ограничением грудного вскармливания и влияние на них двух- и четырехнедельной терапии различными дозами метформина. (*a*) – свободный тироксин; (*b*) – общий тироксин; (*c*) – свободный трийодтиронин; (*d*) – общий трийодтиронин.

Различия с группой К ([a]), между группой EW и группами, обработанными метформином ([b]), и между группами EW-МФ120 и EW-МФ250 ([c]) статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, $n = 12$. Обозначения групп: К (C), EW, EW-МФ120 (EW-MF120), EW-МФ250 (EW-MF250).

исчезал (рис. 3, 4). Необходимо отметить, что в группе EW-МФ250 через 4 недели лечения МФ уровни тиреоидных гормонов и тестостерона были ниже, чем в группе EW-МФ120 (рис. 3, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У человека как голодание в раннем возрасте, так и раннее прекращение грудного вскармливания приводят к отставленным во времени метаболическим и гормональным изменениям, которые в ряде случаев могут быть классифицированы, как

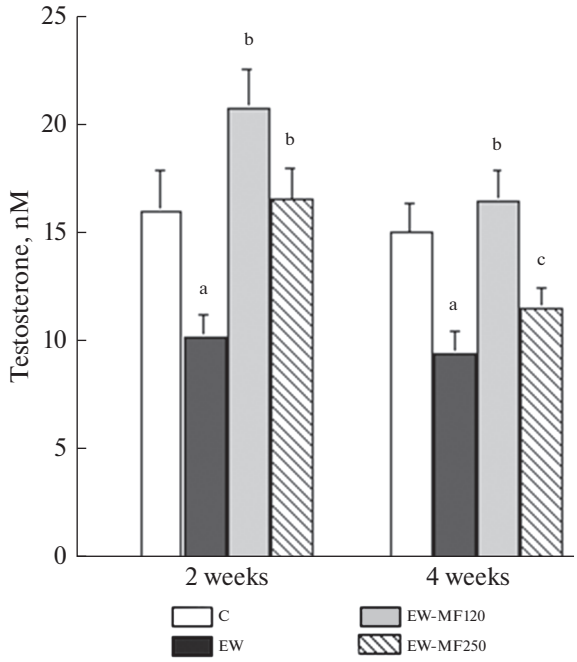


Рис. 4. Уровень тестостерона в крови 10-месячных самцов крыс с ограничением грудного вскармливания и влияние на него двух- и четырехнедельной терапии различными дозами метформина.

Различия с группой К ([a]), между группой EW и группами, обработанными метформином ([b]) и между группами EW-МФ120 и EW-МФ250 ([c]) статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, $n = 12$. Обозначения групп: К (С), EW, EW-МФ120 (EW-MF120), EW-МФ250 (EW-MF250).

МС [4, 21–23]. Причинами этого являются недостаток белка и других нутриентов, необходимых для нормального развития новорожденного, а также ослабление или полное отсутствие регуляторного воздействия на организм множества гормонов и ростовых факторов, поступающих в организм новорожденного в составе грудного молока [4, 12, 21, 24, 25]. Результаты клинических исследований получают подтверждение в экспериментах на крысах с различными моделями нарушения грудного вскармливания, вызванного как обработкой кормящих самок фармакологическими препаратами, подавляющими лактацию (бромокриптин, метилглиоксаль), так и снижением количества и доступности грудного молока вследствие повышения числа крысят в помете или в результате использования бандажа, препятствующего доступу крысят к молочным железам [13–17].

Нами показано, что ингибирование лактации D2-агонистом бромокриптином у кормящих самок приводит к преждевременному прекращению грудного вскармливания потомства, что в дальнейшем, в 10-месячном возрасте, выражается в развитии у них комплекса метаболических и гормональных нарушений, характерных для МС, таких как ожирение, дислипидемия, нарушенная толерантность к глюкозе, гиперлептинемия, постпрандиальная гиперинсулинемия. Эти данные в целом согласуются с результатами других авторов, которые, однако, исследовали животных с ограничением грудного вскармливания в возрасте от трех до шести месяцев. При этом характер изменений имел черты сходства при различных способах индукции прерывания или острой недостаточности грудного вскармливания в ран-

нем постнатальном периоде [13–15, 17, 26]. Так, у трехмесячных крыс с подавлением грудного вскармливания с помощью прооксиданта метилглиоксаля, наряду с ожирением, имелись явные признаки дислипидемии и нарушенной чувствительности к глюкозе [15]. В пятимесячном возрасте у крыс с ограничением грудного вскармливания с помощью бандажа отмечали ожирение, триглицеридемию, повышение доли атерогенных форм холестерина, сильно выраженную гиперлептинемию [14]. Похожие изменения были у шестимесячных крыс, которые, как и в нашем случае, лишались грудного вскармливания на протяжении трех дней при обработке кормящих самок бромокриптином [13]. Следует отметить, что и в нашем исследовании у крыс группы EW в возрасте шести месяцев были повышены масса тела и уровень постпрандиальной глюкозы в крови, что свидетельствует о развитии признаков МС. Тем самым, метаболические нарушения развиваются уже через 3–6 мес, а затем сохраняются в более зрелом возрасте.

Наряду с метаболическими изменениями и снижением чувствительности к инсулину и лептину, в группе EW были выявлены нарушения функций гонадной и тиреоидной осей. Это иллюстрируется андрогенным дефицитом и сниженным уровнем ЛГ, что может указывать на ослабление различных звеньев гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси, а также дефицитом тиреоидных гормонов на фоне значимого повышения уровня ТТГ в крови крыс группы EW, что свидетельствует о развитии у них гипотиреоидного состояния, вызванного снижением ответа тироцитов на ТТГ. Следует отметить, что несмотря на пристальное внимание к вопросу о влиянии недостаточности грудного вскармливания в раннем онтогенезе на эндокринный статус в зрелом возрасте, данные по этому вопросу малочисленны и противоречивы [18–20]. Показано, что недостаток грудного молока, обусловленный большим размером помета, приводит к андрогенному дефициту у взрослых самцов, причем это в большей степени связано с нарушением синтеза тестостерона в семенниках, чем с ослаблением вышележащих звеньев гонадной оси [18]. Ограничение грудного вскармливания как с помощью обработки самок бромокриптином, так и путем ограничения их в пище приводит к снижению у взрослого потомства концентрации в крови некоторых тиреоидных гормонов [19, 20]. У взрослых крыс, родившихся от голодающих в период лактации самок, отмечали повышение уровня ТТГ и соотношения ТТГ/fT4, что, как и в нашем случае, указывает на снижение чувствительности тироцитов к стимулирующему воздействию ТТГ [20]. Так, нами показано, что соотношение концентраций в крови ТТГ и тироксина в группе EW в 3 раза выше, чем в контроле.

Представленные данные свидетельствуют о том, что полноценное грудное вскармливание в ранний постнатальный период имеет критическое значение как для нормального функционирования систем, контролирующих углеводный и липидный обмен, энергетический баланс и гормональный статус организма, так и для формирования в раннем онтогенезе гипоталамо-гипофизарно-гонадной и -тиреоидной осей, ответственных за регуляцию репродуктивных функций, термогенез и другие, зависимые от тиреоидных и половых стероидных гормонов, физиологические процессы. При этом возникающие в результате “неонатального” голодания нарушения в системах, контролирующих метаболизм и эндокринные функции, сохраняются в зрелом возрасте. Соответственно необходимы подходы для их коррекции, среди которых наибольший интерес представляет терапия препаратами, используемыми для лечения МС и сахарного диабета 2-го типа.

Среди фармакологических подходов для коррекции МС наибольший интерес представляет МФ, который широко применяется для лечения метаболических расстройств, характеризующихся ожирением, ИР, нарушением глюкозного гомеостаза, дислипидемией, повышением индекса атерогенности [3–5]. МФ-терапия значимо восстанавливает метаболические и гормональные показатели у грызунов с

экспериментальными моделями МС и сахарного диабета 2-го типа, что ранее продемонстрировано нами [27, 28], и другими авторами [29–31]. Важное значение имеет выбор дозы МФ, поскольку высокие дозы как в клинике, так и в экспериментах на животных способны привести к нежелательным эффектам, среди которых лактоацидоз и нарушения функций желудочно-кишечного тракта, в то время как низкие дозы не всегда эффективны, особенно при лечении сильно выраженных метаболических расстройств [32–34]. Нами показано, что относительно высокая доза МФ (250 мг/кг/сутки) в большей степени восстанавливает метаболические показатели у EW-крыс в сравнении со средней дозой препарата (120 мг/кг/сутки), хотя различия между группами EW-МФ120 и EW-МФ250 не были статистически значимыми, за исключением различий в уровне триглицеридов, который в группе EW-МФ120 оставался более высоким в сравнении с группой EW-МФ250 (табл. 1, рис. 1, 2). Тем самым, нами впервые показана эффективность МФ при коррекции метаболических расстройств, индуцированных EW, а также выявлена зависимость восстанавливающего эффекта МФ от его дозы.

Четырехнедельная обработка крыс с помощью средней дозы МФ в значительной степени восстанавливала уровни тиреоидных гормоном и тестостерона, а также нормализовала повышенный у EW-крыс уровень ТТГ и сниженный у них уровень ЛГ. Это свидетельствует об отчетливо выраженном восстановительном потенциале МФ в отношении нарушенных вследствие EW эндокринных функций. Однако несмотря на более выраженный эффект на метаболические показатели, четырехнедельная обработка МФ в более высокой дозе была менее эффективна в отношении восстановления гормонального статуса тиреоидной и гонадной осей, слабо или вовсе не влияя на оцениваемые гормональные показатели (табл. 2, рис. 2, 3). Важно отметить, что через 2 недели восстанавливающий эффект высокой дозы МФ на уровни тиреоидных гормонов и тестостерона был еще сопоставим с таковым, вызываемым средней дозой, но в дальнейшем, через 4 недели, затухал (рис. 3, 4). Такая динамика эффекта высоких доз МФ может быть обусловлена как побочными эффектами МФ-терапии, так и избыточной активацией АМФ-активируемой протеинкиназы, основной мишени действия этого препарата, в том числе в гипофизе, семенниках и щитовидной железе, основных компонентах гонадной и тиреоидной осей [9, 29, 35].

До наших исследований информация о влиянии МФ на эндокринные функции у потомства с метаболическими и гормональными расстройствами, вызванными ограничением или лишением грудного вскармливания, отсутствовала. В то же время имелись данные о том, что МФ-терапия при диабете и МС способна улучшать функции тиреоидной [36–38] и гонадной осей [9, 39, 40]. Это обусловлено способностью препарата восстанавливать активность гипоталамических нейронов, секретирующих рилизинг-факторы, а также нормализовать метаболические процессы в гипофизе, щитовидной железе и гонадах. У пациентов с ИР лечение МФ вызывало снижение повышенного уровня ТТГ [36–38] и повышало уровень трийодтиронина, основного эффекторного гормона тиреоидной оси [37], что может указывать на повышение чувствительности тироцитов к ТТГ. Сходные результаты были получены и в экспериментах с диабетическими животными [41]. Установлено, что лечение МФ улучшает сперматогенез и тестикулярный стероидогенез у пациентов с МС и диабетической патологией [40, 42, 43]. Лечение МФ самцов крыс и мышей с различными моделями МС и диабета усиливало ответ семенников на гонадотропины, подавляло апоптотические и воспалительные процессы в тестикулярных клетках, улучшало сперматогенез, результатом чего были нормализация андрогенного статуса и восстановление фертильности [44–47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами установлено, что дефицит грудного вскармливания в раннем онтогенезе у самцов крыс в зрелом возрасте приводит к ожирению, нарушенной толерантности к глюкозе, снижению чувствительности к инсулину, гиперлептинемии, дислипидемии, к андрогенной недостаточности и гипотиреоидному состоянию с характерными для него снижением уровней тиреоидных гормонов и повышением уровня ТТГ. Четырехнедельное лечение крыс МФ в средней дозе (120 мг/кг/сутки) снижало массу тела и жировой ткани, частично восстанавливало метаболические показатели, в полной мере нормализовало гормональный статус гонадной и тиреоидной систем. Лечение МФ в более высокой дозе (250 мг/кг/сутки) оказалось эффективнее в отношении восстановления метаболических показателей, уровней лептина и инсулина, но сравнительно слабо влияло на уровни тестостерона, тиреоидных гормонов, ЛГ и ТТГ. Необходимо, однако, отметить, что через две недели лечения эффективность обеих использованных доз МФ была сопоставимой. Таким образом, впервые показано, что длительное лечение самцов крыс группы EW средними дозами МФ улучшает метаболические показатели и полностью восстанавливает гормональный статус тиреоидной и гонадной систем, что указывает на перспективность применения таких доз для коррекции МС, вызванного нарушением грудного вскармливания.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К.В.Д., А.О.Ш.), проведение экспериментов (К.В.Д., В.М.Б, Т.С.Ш.) сбор и обработка данных (К.В.Д., В.М.Б.), написание и редактирование манускрипта (К.В.Д., А.О.Ш.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлялось за счет средств государственного бюджета Минобрнауки России по государственному заданию № 075-0152-22-00, с использованием оборудования ЦКП Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Smith CJ, Ryckman KK* (2015) Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. Diabetes Metab Syndr Obes 8: 295–302. https://doi.org/10.2147/DMSO.S61296
2. *Cwynar-Zając Ł* (2021) Metformin - a new approach. Pediatr Endocrinol Diabetes Metab 27: 134–140. https://doi.org/10.5114/pedm.2021.107166
3. *Guo Z, Priefer R* (2021) Current progress in pharmacogenomics of Type 2 diabetes: A systemic overview. Diabetes Metab Syndr 15: 102239. https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.102239
4. *Picó C, Reis F, Egas C, Mathias P, Matafome P* (2021) Lactation as a programming window for metabolic syndrome. Eur J Clin Invest 51: e13482. https://doi.org/10.1111/eci.13482
5. *Tulipano G* (2021) Integrated or Independent Actions of Metformin in Target Tissues Underlying Its Current Use and New Possible Applications in the Endocrine and Metabolic Disorder Area. Int J Mol Sci 22: 13068. https://doi.org/10.3390/ijms222313068
6. *Kononova YA, Likhonosov NP, Babenko AY* (2022) Metformin: Expanding the Scope of Application-Starting Earlier than Yesterday, Canceling Later. Int J Mol Sci 23: 2363. https://doi.org/10.3390/ijms23042363

7. *Top WMC, Kooy A, Stehouwer CDA* (2022) Metformin: A Narrative Review of Its Potential Benefits for Cardiovascular Disease, Cancer and Dementia. Pharmaceuticals (Basel) 15: 312. https://doi.org/10.3390/ph15030312
8. *Kalra S, Aggarwal S, Khandelwal D* (2019) Thyroid Dysfunction and Type 2 Diabetes Mellitus: Screening Strategies and Implications for Management. Diabetes Ther 10: 2035–2044. https://doi.org/10.1007/s13300-019-00700-4
9. *Shpakov AO* (2021) Improvement Effect of Metformin on Female and Male Reproduction in Endocrine Pathologies and Its Mechanisms. Pharmaceuticals (Basel) 14: 42. https://doi.org/10.3390/ph14010042
10. *Kimber-Trojnar Ż, Dłuski DF, Wierzchowska-Opoka M, Ruszała M, Leszczyńska-Gorzelak B* (2022) Metformin as a Potential Treatment Option for Endometriosis. Cancers (Basel) 14: 577. https://doi.org/10.3390/cancers14030577
11. *Magzoub R, Kheirelseid EAH, Perks C, Lewis S* (2022) Does metformin improve reproduction outcomes for non-obese, infertile women with polycystic ovary syndrome? Meta-analysis and systematic review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 271: 38–62. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2022.01.025
12. *Badillo-Suárez PA, Rodríguez-Cruz M, Nieves-Morales X* (2017) Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. J Mammary Gland Biol Neoplasia 22: 171–191. https://doi.org/10.1007/s10911-017-9382-y
13. *Lima Nda S, de Moura EG, Passos MC, Nogueira Neto FJ, Reis AM, de Oliveira E, Lisboa PC* (2011) Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. Br J Nutr 105: 1405–1413. https://doi.org/10.1017/S0007114510005064
14. *Lima Nda S, Franco JG, Peixoto-Silva N, Maia LA, Kaezer A, Felzenszwalb I, de Oliveira E, de Moura EG, Lisboa PC* (2014) Ilex paraguariensis (yerba mate) improves endocrine and metabolic disorders in obese rats primed by early weaning. Eur J Nutr 53: 73–82. https://doi.org/10.1007/s00394-013-0500-3
15. *Francisco FA, Barella LF, Silveira SDS, Saavedra LPJ, Prates KV, Alves VS, Franco CCDS, Miranda RA, Ribeiro TA, Tófolo LP, Malta A, Vieira E, Palma-Rigo K, Pavanello A, Martins IP, Moreira VM, de Oliveira JC, Mathias PCF, Gomes RM* (2018) Methylglyoxal treatment in lactating mothers leads to type 2 diabetes phenotype in male rat offspring at adulthood. Eur J Nutr 57: 477–486. https://doi.org/10.1007/s00394-016-1330-x
16. *Souza LL, de Moura EG, Lisboa PC* (2020) Does early weaning shape future endocrine and metabolic disorders? Lessons from animal models. J Dev Orig Health Dis 11: 441–451. https://doi.org/10.1017/S2040174420000410
17. *Lisboa PC, Miranda RA, Souza LL, Moura EG* (2021) Can breastfeeding affect the rest of our life? Neuropharmacology 200: 108821. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108821
18. *Smith JT, Spencer SJ* (2012) Preweaning over- and underfeeding alters onset of puberty in the rat without affecting kisspeptin. Biol Reprod 86: 145. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097758
19. *Ayala-Moreno R, Racotta R, Anguiano B, Aceves C, Quevedo L* (2013) Perinatal undernutrition programmes thyroid function in the adult rat offspring. Br J Nutr 110:2207–2215. https://doi.org/10.1017/S0007114513001736
20. *Pietrobon CB, Bertasso IM, Silva BS, Peixoto-Silva N, Oliveira E, Moura EG, Lisboa PC* (2020) Body Adiposity and Endocrine Profile of Female Wistar Rats of Distinct Ages that were Early Weaned. Horm Metab Res 52: 58–66. https://doi.org/10.1055/a-0966-8784
21. *Liu L, Wang W, Sun J, Pang Z* (2018) Association of famine exposure during early life with the risk of type 2 diabetes in adulthood: a meta-analysis. Eur J Nutr 57: 741–749. https://doi.org/10.1007/s00394-016-1363-1
22. *Zhou J, Zhang L, Xuan P, Fan Y, Yang L, Hu C, Bo Q, Wang G, Sheng J, Wang S* (2018) The relationship between famine exposure during early life and body mass index in adulthood: A systematic review and meta-analysis. PLoS One 13: e0192212. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192212
23. *Xin X, Wang W, Xu H, Li Z, Zhang D* (2019) Exposure to Chinese famine in early life and the risk of dyslipidemia in adulthood. Eur J Nutr 58: 391–398. https://doi.org/10.1007/s00394-017-1603-z
24. *Jiang X, Ma H, Wang Y, Liu Y* (2013) Early life factors and type 2 diabetes mellitus. J Diabetes Res 2013: 485082. https://doi.org/10.1155/2013/485082
25. *Qin LL, Luo BA, Gao F, Feng XL, Liu JH* (2020) Effect of Exposure to Famine during Early Life on Risk of Metabolic Syndrome in Adulthood: A Meta-Analysis. J Diabetes Res 2020: 3251275. https://doi.org/10.1155/2020/3251275

26. *Pietrobon CB, Miranda RA, Bertasso IM, Mathias PCF, Bonfleur ML, Balbo SL, Reis MAB, Latorraca MQ, Arantes VC, de Oliveira E, Lisboa PC, de Moura EG* (2020) Early weaning induces short- and long-term effects on pancreatic islets in Wistar rats of both sexes. J Physiol 598: 489–502. https://doi.org/10.1113/JP278833
27. *Derkach KV, Bondareva VM, Kornyushin OV, Galagudza MM, Shpakov AO* (2020) Restoration of β-Adrenergic Signaling and Activity of Akt-Kinase and AMP-Activated Protein Kinase with Metformin in the Myocardium of Diabetic Rats. Bull Exp Biol Med 169: 24–28. https://doi.org/10.1007/s10517-020-04816-7
28. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Sorokoumov VN, Stepochkina AM, Romanova IV, Morina IY, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO* (2021) The Effects of Separate and Combined Treatment of Male Rats with Type 2 Diabetes with Metformin and Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone Receptor on Steroidogenesis and Spermatogenesis. Int J Mol Sci 23: 198. https://doi.org/10.3390/ijms23010198
29. *Meng XM, Ma XX, Tian YL, Jiang Q, Wang LL, Shi R, Ding L, Pang SG* (2017) Metformin improves the glucose and lipid metabolism via influencing the level of serum total bile acids in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. Eur Rev Med Pharmacol Sci 21: 2232–2237.
30. *Kim HW* (2021) Metabolomic Approaches to Investigate the Effect of Metformin: An Overview. Int J Mol Sci 22: 10275. https://doi.org/10.3390/ijms221910275
31. *Lee YF, Sim XY, Teh YH, Ismail MN, Greimel P, Murugaiyah V, Ibrahim B, Gam LH* (2021) The effects of high-fat diet and metformin on urinary metabolites in diabetes and prediabetes rat models. Biotechnol Appl Biochem 68: 1014–1026. https://doi.org/10.1002/bab.2021
32. *Kanto K, Ito H, Noso S, Babaya N, Hiromine Y, Taketomo Y, Toma J, Niwano F, Yasutake S, Kawabata Y, Ikegami H* (2017) Effects of dosage and dosing frequency on the efficacy and safety of high-dose metformin in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. J Diabetes Investig 9: 587–593. https://doi.org/10.1111/jdi.12755
33. *DeFronzo R, Fleming GA, Chen K, Bicsak TA* (2016) Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. Metabolism 65: 20–29. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.014
34. *Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtyukov A, Romanova I, Bayunova L, Shpakov A* (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. PLoS One 14: e0213779. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779
35. *Rena G, Hardie DG, Pearson ER* (2017) The mechanisms of action of metformin. Diabetologia 60: 1577–1585. https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z
36. *Dimic D, Golubovic MV, Radenkovic S, Radojkovic D, Pesic M* (2016) The effect of metformin on TSH levels in euthyroid and hypothyroid newly diagnosed diabetes mellitus type 2 patients. Bratisl Lek Listy 117: 433–435. https://doi.org/10.4149/bll_2016_084
37. *Sui M, Yu Y, Zhang H, Di H, Liu C, Fan Y* (2018) Efficacy of Metformin for Benign Thyroid Nodules in Subjects With Insulin Resistance: A Systematic Review and Meta-Analysis. Front Endocrinol (Lausanne) 9: 494. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00494
38. *Haroon SM, Khan K, Maqsood M, Iqbal S, Aleem M, Khan TU* (2021) Exploring the Effect of Metformin to Lower Thyroid-Stimulating Hormone in Euthyroid and Hypothyroid Type-2 Diabetic Patients. Cureus 13: e13283. https://doi.org/10.7759/cureus.13283
39. *Alves MG, Martins AD, Vaz CV, Correia S, Moreira PI, Oliveira PF, Socorro S* (2014) Metformin and male reproduction: effects on Sertoli cell metabolism. Br J Pharmacol 171: 1033–1042. https://doi.org/10.1111/bph.12522
40. *Faure M, Bertoldo MJ, Khoueiry R, Bongrani A, Brion F, Giulivi C, Dupont J, Froment P* (2018) Metformin in Reproductive Biology. Front Endocrinol (Lausanne) 9: 675. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00675
41. *Hu X, Liu Y, Wang C, Hou L, Zheng X, Xu Y, Ding L, Pang S* (2017) Metformin affects thyroid function in male rats. Oncotarget 8: 107589–107595. https://doi.org/10.18632/oncotarget.22536
42. *Casulari LA, Caldas AD, Domingues Casulari Motta L, Lofrano-Porto A* (2010) Effects of metformin and short-term lifestyle modification on the improvement of male hypogonadism associated with metabolic syndrome. Minerva Endocrinol 35: 145–151.

43. *Morgante G, Tosti C, Orvieto R, Musacchio MC, Piomboni P, De Leo V* (2011) Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-asthenozoospermic men with metabolic syndrome. Fertil Steril 95: 2150–2152.
https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.12.009
44. *Yan WJ, Mu Y, Yu N, Yi TL, Zhang Y, Pang XL, Cheng D, Yang J* (2015) Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. J Assist Reprod Genet 32: 1097–1104.
https://doi.org/10.1007/s10815-015-0506-2
45. *Annie L, Jeremy M, Gurusubramanian G, Derkach KV, Shpakov AO, Roy VK* (2020) Effect of metformin on testicular expression and localization of leptin receptor and levels of leptin in the diabetic mice. Mol Reprod Dev 87: 620–629.
https://doi.org/10.1002/mrd.23342
46. *Derkach KV, Bakhtyukov AA, Romanova IV, Zorina II, Bayunova LV, Bondareva VM, Yu Morina I, Kumar Roy V, Shpakov AO* (2020) The effect of metformin treatment on the basal and gonadotropin-stimulated steroidogenesis in male rats with type 2 diabetes mellitus. Andrologia 52: e13816.
https://doi.org/10.1111/and.13816
47. *Koroglu Aydın P, Karabulut-Bulan O, Bugan I, Turkyilmaz IB, Altun S, Yanardag R* (2022) The protective effect of metformin against testicular damage in diabetes and prostate cancer model. Cell Biochem Funct 40: 60–70.
https://doi.org/10.1002/cbf.3674

Effectiveness of Various Metformin Doses for the Restoration of Metabolic Indices and Hormonal Status in Early Weaned Male Rats

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

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

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

Early weaning (EW) leads to metabolic disorders in adulthood, being one of the causes of metabolic syndrome (MS). However, the range of hormonal disorders in EW has not been studied well enough, and approaches to its correction have not been developed. The aim of this work was to study metabolic and hormonal changes, including in the hormonal status of the gonadal and thyroid axes, in adult (10-month-old) male rats that were weaned in the early postnatal period, as well as to explore the restorative effect of 4-week treatment with different doses of metformin (MF) – moderate (120 mg/kg/day) and relatively high (250 mg/kg/day) – on these changes. Lactation in nursing female rats was interrupted with bromocriptine (10 mg/kg/day) on days 19–21 of lactation. After forced starvation during this period, rat pups were transitioned to a standard diet. At the age of 10 months, early weaned male rats showed characteristic signs of MS, such as obesity, impaired glucose tolerance, insulin resistance, hyperleptinemia, and dyslipidemia. They also had reduced levels of testosterone, luteinizing hormone (LH), and thyroid hormones, and elevated levels of the thyroid-stimulating hormone (TSH). A 4-week treatment of adult rats with MF at a moderate dose reduced body and fat weight, partially restored metabolic parameters, and completely normalized testosterone, LH, thyroxine, triiodothyronine and TSH levels. The treatment with MF at a relatively high dose restored metabolic parameters more effectively, normalized leptin and insulin levels, but had a little effect on hormonal levels of the gonadal and thyroid axes. Thus, long-term treatment of early weaned male rats with a moderate dose of MF improves metabolic parameters and completely restores the hormonal status of the gonadal and thyroid axes, which indicates the promise of using such doses for the correction of MS and endocrine dysfunctions caused by interrupted or ineffective breastfeeding.

Keywords: metabolic syndrome, early weaning, offspring, hyperleptinemia, thyroid-stimulating hormone, thyroid hormone, androgen deficiency

EDN: TZAAYN
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 8, с. 1042–1057

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РЕАКЦИЯ ВЕРТИКАЛЬНОЙ ПОЗЫ ЧЕЛОВЕКА НА ОДИНОЧНЫЕ ЗВУКОВЫЕ СИГНАЛЫ РАЗНОГО ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ

© 2022 г. О. П. Тимофеева[1], И. Г. Андреева[1, *]

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

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

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.
После доработки 28.06.2022 г.
Принята к публикации 29.06.2022 г.

Прослушивание биологически значимой звуковой информации приводит к непроизвольной постуральной подготовке для последующего двигательного ответа. В работе исследованы постуральные показатели, характеризующие изменения вертикальной позы человека в ответ на одиночные короткие биологически значимые звуковые стимулы. В первой части работы психоакустический эксперимент выполняли с применением системы невербальной изобразительной оценки при участии группы из 46 испытуемых. По его результатам были выбраны три звуковых стимула длительностью около 1 с: два негативного содержания (женский крик и звук тормоза автомобиля) и эмоционально нейтральный стимул – звонок телефона. Во второй части работы выполняли регистрацию положения центра давления (ЦД) тела в ответ на эти три стимула в группе из 21 испытуемого. Анализ данных в течение 8 с после начала стимула (время формирования постурального ответа) выявил увеличение по сравнению с тишиной следующих стабилометрических показателей: длины траектории перемещения ЦД, его скорости и разброса по обеим осям, площади доверительного эллипса. Данный методический прием оказался устойчивым к вариабельности латентности и амплитуды постурального ответа. Согласно полученным результатам, короткие (менее продолжительности постурального ответа) звуки независимо от их эмоционального содержания приводили к кратковременной небольшой дестабилизации позы. Наибольшие изменения были получены по интегральному показателю площадь доверительного эллипса, они составили 36–39% по средним данным для разных стимулов.

Ключевые слова: позный контроль, эмоционально значимые звуковые стимулы, центр давления тела, дестабилизирующее действие

DOI: 10.31857/S0869813922080088

ВВЕДЕНИЕ

Одна из ключевых функций слуховой системы состоит в получении дистантных биологически значимых сигналов. К ним могут быть отнесены сигналы о движении объектов, видоспецифические сигналы, а также сигналы, регулирующие повседневное поведение. Их интерпретация обязательно содержит эмоциональный компонент и в результате побуждает к определенным действиям. Поэтому прослушивание биологически значимой звуковой информации должно приводить к непроизвольной постуральной подготовке для последующего движения. В ходе эво-

люции были сформированы противоположные типы двигательных реакций в зависимости от значения звуковых стимулов: увеличение активности или замирание. В первом случае изменения контроля позы предполагает увеличение колебаний центра давления (ЦД) тела, а во втором – их уменьшение.

Постуральный ответ на сложный биологически значимый звуковой сигнал опосредован механизмами мультисенсорного контроля и формируется в течение длительного времени. Вследствие этого в исследованиях контроля позы при звуковой стимуляции применяют преимущественно длительные, т.е. превышающие продолжительность постурального ответа, или ритмически организованные стимулы [1–4]. В исследовании [5] выполняли стимуляцию короткими по длительности (1.6–4.8 с) сигналами – движущимися звуковыми образами, и получили в ответ изменение положения ЦД тела в сторону, противоположную направлению движения звукового образа. Однако латентность и амплитуда таких постуральных ответов существенно варьировали не только от человека к человеку, но при ответах одного и того же испытуемого. Исследования позных реакций на короткие одиночные сигналы биологически значимого содержания в литературе нами не обнаружены, кроме работы [6]. В ней было показано, что слуховые раздражители длительностью 6 с приводят к ухудшению контроля равновесия и повышению риска падения. Длительность стимула в последней работе была сопоставима с продолжительностью постурального ответа.

Продолжительность формирования позного ответа и нестабильность его характеристик затрудняют изучение влияния коротких одиночных стимулов на контроль позы и интерпретацию полученных результатов. Короткой длительностью в данном случае можно рассматривать такую, которая меньше, чем продолжительность формирования самого постурального ответа. Таким образом, остается неясным, как короткие звуковые сигналы влияют на постуральный контроль. Это влияние представляет интерес в связи с возможностями применения звуковой стимуляции при реабилитации пациентов с нарушениями опорно-двигательного аппарата путем создания кратковременного дестабилизирующего воздействия с различных направлений, включая заднее полупространство, недоступное для зрительной стимуляции. Другим возможным практическим применением таких сигналов является их использование в диагностических исследованиях при оценке устойчивости пациентов, т.к. в повседневной жизни часто встречаются именно короткие сигналы информационно и биологически важного содержания.

При изучении воздействия дистантной информации на позу применяют сигналы высокой биологической значимости, такие сигналы неизбежно имеют эмоциональное содержание. Воздействия эмоционально значимых сигналов подробно изучены для зрительного анализатора [7]. Известно, что просмотр изображений с отрицательной валентностью оказывает большее влияние на контроль позы по сравнению с нейтральной или положительной валентностью. В работах отмечается два типа реакций. В одних работах [8, 9] было зафиксировано значительное уменьшение раскачивания тела во время просмотра неприятных снимков. Такую реакцию авторы этих работ трактуют как “замирание” или “брадикардию страха”, наблюдаемые у многих видов при столкновении с угрожающими стимулами. В других работах отмечали смещение положения ЦД тела от негативного стимула, что рассматривается как тенденция к избеганию негативных ситуаций [10, 11].

Позднее было проведено исследование слухового воздействия нейтральных, приятных и негативных стимулов [6]. Результаты этой работы показали, что влияние слуховых стимулов на контроль равновесия зависит от их аффективного содержания. Было выявлено дестабилизирующее действие слуховых негативных стимулов на контроль равновесия. По сравнению с исходным состоянием (без звука) неприятные слуховые стимулы увеличивали постуральное покачивание, в то время

как приятные и нейтральные слуховые стимулы не вызывали реакции. Таким образом, на зрительные и слуховые стимулы негативного содержания были показаны позные ответы, соответствующие упоминавшимся выше эволюционно сформированным реакциям.

Цель настоящего исследования – выявить постуральные показатели, характеризующие изменения вертикальной позы человека в ответ на одиночные короткие биологически значимые звуковые стимулы, и оценить возможные различия в постуральных ответах на сигналы разного эмоционального содержания.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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 (протокол заседания Этического комитета ИЭФБ РАН по биоэтике № 1-02 от 25 февраля 2021 г.).

Эксперимент 1. В первой части работы испытуемые выполняли эмоциональную оценку звуковых сигналов. В исследовании приняло участие 46 испытуемых в возрасте от 18 до 60 лет (25 женщин и 21 мужчина, средний возраст – 41 ± 2 года. Здесь и далее показаны среднее и ошибка среднего). Все испытуемые прошли предварительное тестирование на состояние периферического и центрального отделов слухового анализатора. Все испытуемые, принимавшие участие в исследовании, имели нормальный слух. Эксперимент 1 состоял в выполнении эмоциональной оценки предложенных звуковых стимулов. Каждый из испытуемых прослушивал последовательность из 22 звуковых стимулов, подаваемых через наушники Sennheiser HD 280 на комфортном для испытуемого уровне интенсивности. Звуки разного смыслового и эмоционального содержания были выбраны из библиотеки аудиоредактора Acoustica Mixcraft (https://mixcraft.ru/). Применяли звуки, встречающиеся в повседневной жизни, такие как телефонный звонок, скрип тормозов, лай собаки и другие (14 сигналов), а также искусственно синтезированные звуки (8 сигналов), которые не соотносились с реально существующими объектами. Эти звуки представляли собой широкополосные шумовые сигналы с различной временной динамикой и спектральными максимумами. После прослушивания каждого звука испытуемый выполнял его эмоциональную оценку, для которой была использована система невербальной изобразительной оценки (манекен самооценки). Эта система была разработана Lang [12], она часто используется для эмоциональных оценок стимулов различной модальности [13, 14]. В этой системе каждый стимул оценивается в трех измерениях: валентности (знак эмоции), возбуждения (выраженность эмоции) и доминирования (личной позиции испытуемого по поводу эмоции). В трех рядах – измерениях, графически представлено по пять фигур, каждая из которых выражает аффективное состояние. Для каждого ряда под фигурами, а также под промежутками между двумя последовательными картинками предложены количественные оценки, которые формируют 9-балльную шкалу: валентность (от 1–хмурая, несчастная фигура, до 9, улыбающаяся, счастливая фигура); возбуждение (от 1 – расслабленная, сонная фигура, до 9, возбужденная фигура); доминирование (от 1 – маленькая фигура, представляющая контролируемое существо, до 9 – большая фигура, представляющая контролирующее, подавляющее существо). Каждое испытание проводили в собственном темпе испытуемого, при этом он мог прослушивать каждый звук неограниченное количество раз. Средняя продолжительность испытания составляла у разных испытуемых от 12 до 30 мин.

Таблица 1. Временные и спектральные характеристики биологически значимых звуковых сигналов

Характеристика	Женский крик	Тормоз автомобиля	Звонок телефона
Длительность, мс	1000	850	1000
Длительность фронта нарастания, мс	200	38	19
Спектральные максимумы, Гц	1500, 3000, 4600	1000, 2000	1200, 1500, 3000, 3800, 5400, 6700, 8200
Спектральный диапазон, Гц	500–4900	0–5000	0–10000

Проверка на нормальность распределения балльных оценок по трем шкалам в группе испытуемых осуществлялась с применением непараметрического теста Шапиро–Уилка. Для анализа влияния различий эмоциональных оценок у испытуемых разного пола они были разделены на группы: женщины (24 человека, возраст 40 ± 3 года) и мужчины (22 человека, возраст 41 ± 4 года). Последующий статистический анализ для сравнения эмоциональных оценок звуковых стимулов группами испытуемых выполняли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

Эксперимент 2. В исследовании приняла участие группа из 21 испытуемого с нормальным слухом, без диагностированных нарушений вестибулярной системы и опорно-двигательного аппарата в возрасте от 18 до 58 лет (12 женщин и 9 мужчин, средней возраст 29 ± 3 года). Состояние слуха испытуемых оценивали при помощи тональной аудиометрии, которую проводили на клиническом аудиометре АА-02 (Биомедилен). В дополнение к тональной аудиометрии оценку временного разрешения слуха выполняли с применением теста на обнаружение паузы [15]. Все испытуемые, участвовавшие в экспериментах, успешно прошли аудиометрический тест и тест на обнаружение паузы.

Применяли три различных биологически значимых сигнала: женский крик (видоспецифический сигнал), звук тормозов автомобиля (звук движущегося объекта), звонок механического телефона (сигнал, регулирующий повседневное поведение). Стимулы были выбраны по результатам Эксперимента 1: два первых были негативного эмоционального содержания, а третий – нейтрального. Осциллограммы и сонограммы сигналов представлены на рис. 1. Длительность этих сигналов не превышала 1 с. Фронты нарастания уровней сигналов различались в 2 и 10.5 раз. Спектральные максимумы всех трех сигналов располагались в области частот выше 1 КГц. Основные временные и спектральные параметры трех сигналов представлены в табл. 1.

Звуковую стимуляцию выполняли с громкоговорителя Klipsch R-3800-C, расположенного прямо перед испытуемым на расстоянии 2.0 м, на высоте 1.2 м. Генерацию звука производили с компьютера через USB-аудиоинтерфейс Creative E-MU 0202. Уровень сигнала на громкоговорителе регулировали при помощи усилителя мощности NevaAudio SA-3004. Измерения уровня сигнала в месте головы испытуемого производили с применением микрофона 41–45, предусилителя 26– 39 и усилителя 26–06 от Brüel and Kjœr. Уровень всех звуковых стимулов в месте прослушивания составил 72 дБ уровня звукового давления.

Регистрацию постуральных показателей проводили в звукоизолированной камере объемом 62.2 м^3, имеющей специальное покрытие потолка, стен и пола, обеспечивающее условия для свободного поля. Уровень ослабления внешнего шума в камере был не менее 40 дБ в диапазоне частот от 0.5 до 16 кГц. Для оценки посту-

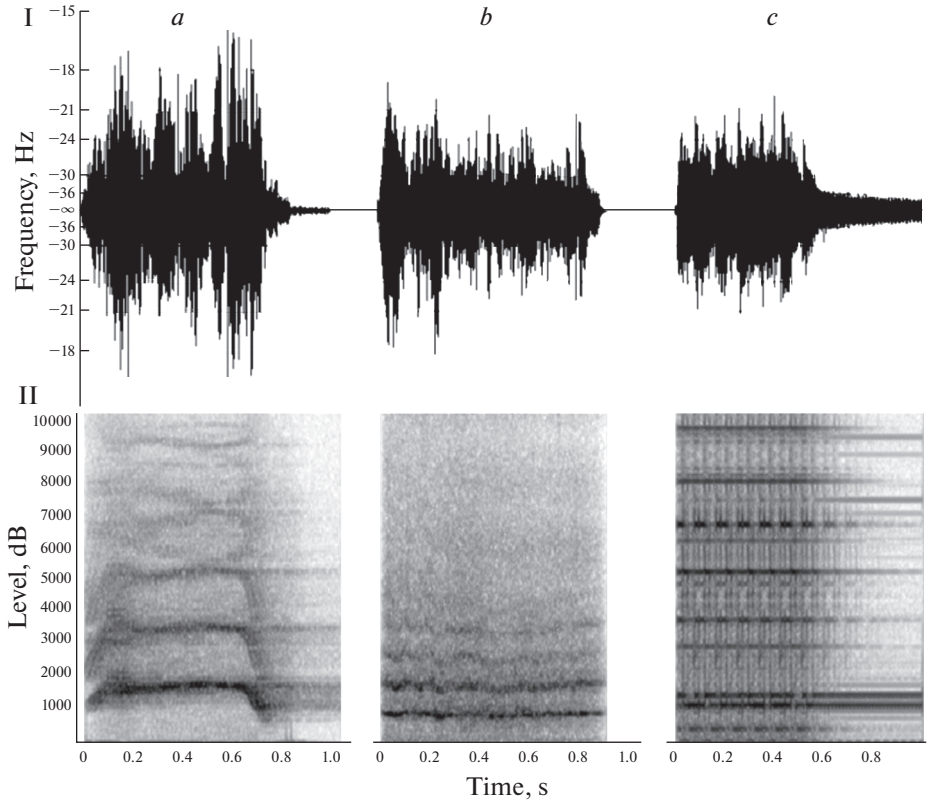


Рис. 1. Осциллограммы (I) и спектрограммы (II) трех звуковых сигналов – женского крика (*a*), тормоза автомобиля (*b*) и звонка телефона (*c*).
I –по оси абсцисс – время в с, по оси ординат – частота сигнала, Гц. II – по оси абсцисс – время в с, по оси ординат – уровень сигнала, дБ.

ральных показателей применяли стабилоплатформу “Стабилан 01” из перечня зарегистрированных в России в качестве изделия медицинского назначения [16]. Испытуемый стоял на стабилометрической платформе в позе “пятки вместе, носки врозь”, руки свободно опущены вдоль тела. Платформа располагалась на массивной опоре в центре камеры. Испытуемого просили стоять неподвижно с закрытыми глазами во время всего эксперимента. Изменения положения ЦД тела регистрировали с применением программы Stabmed 2.05. Частота дискретизации оценки положения ЦД составляла 50 Гц.

Стабилометрическое исследование включало контрольную стойку с закрытыми глазами в тишине и шесть экспериментальных стоек с закрытыми глазами. Во время каждой из них в случайном порядке и с квазислучайными интервалами предъявляли три различных звуковых сигнала. Длительность каждой стойки составляла 72–78 с. В каждой экспериментальной стойке первый сигнал звучал на 20-й секунде с момента начала регистрации, второй – на 40–44-й секунде, третий – на 60–66-й секунде. Пример временной последовательности стимуляции и выбора периодов анализа в двух стойках показан на рис. 2. Начало периода анализа совпадает с началом звукового стимула. После каждых двух регистраций испытуемому предоставляли 2–3-минутный период отдыха. Общая продолжительность регистрации была не более 30 мин.

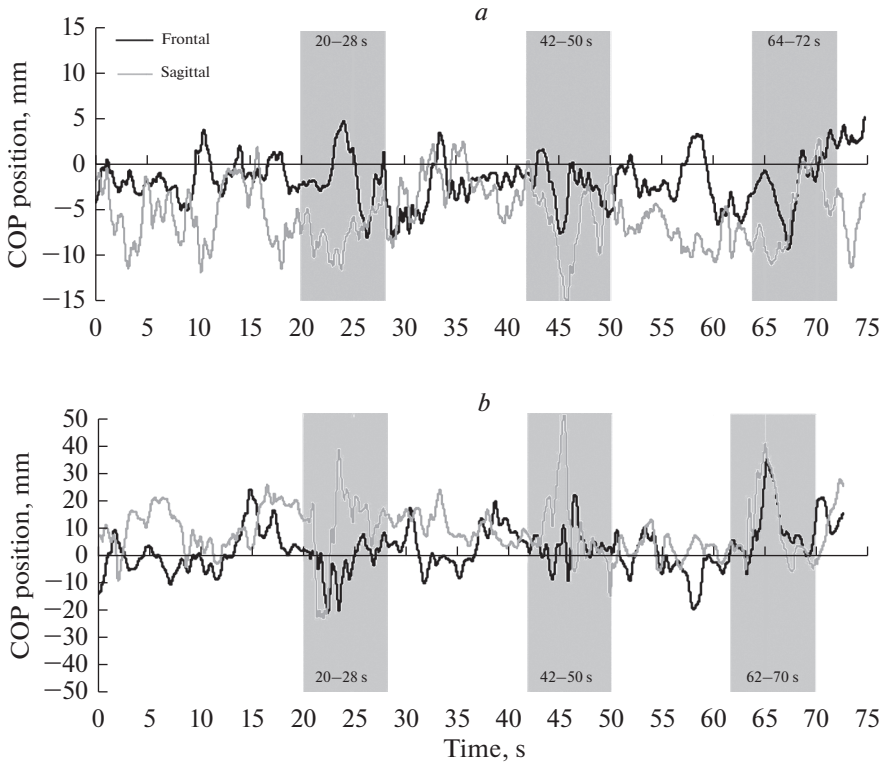


Рис. 2. Индивидуальные стабиллограммы для испытуемых № 15 (*a*) и № 10 (*b*) по сагиттальной и фронтальной осям.

По оси абсцисс – время в с, по оси ординат – положение ЦД тела, мм. Области серого цвета показывают периоды длительностью 8 с, в которых выполняли анализ положения ЦД тела.

Для анализа результатов применяли фрагменты полученных записей стабилограмм длительностью 8 с. Выбор длительности периода регистрации обусловлен результатами экспериментов Агаевой с соавт. [5]. Согласно этой работе, постуральный ответ на кратковременное звучание движущихся источников звука имеет латентность 0.5–3 с и продолжается в течение примерно 3–5 с. В нашем случае для контрольной стойки фрагменты начинались с 20-, 40- и 60-й секунд регистрации, т.е. с моментов предъявления звукового сигнала в экспериментальных стойках. Для каждого из трех фрагментов одной записи определяли следующие показатели колебаний ЦД тела: длину траектории перемещения ЦД тела (далее длина траектории), линейную скорость перемещения ЦД тела (далее скорость) и разброс положения ЦД тела (далее разброс) вдоль сагиттальной и фронтальной осей (табл. 2). Помимо характеристик колебания ЦД вдоль одной из осей оценивали интегральные показатели вертикальной позы: площадь доверительного эллипса (далее площадь эллипса), характеризующую часть площади опоры, в которой перемещается во фронтальной и сагиттальной плоскости ЦД при стоянии и его сжатие, а также показатель “качество функции равновесия” [17]. Последний показатель оценивает, насколько минимальна скорость перемещения ЦД.

Статистические расчеты проводили в пакете программ Statistica v.5.5A. Достоверность различий величин стабилографических показателей от контрольных зна-

Таблица 2. Формулы расчета стабилографических показателей согласно [17]

Стабилографический показатель	Определение	Формула
Длина траектории ЦД по фронтали и сагиттали (LX, LY)	Длина составляющих стабилографического сигнала – фронтальная и сагиттальная	$LX = \sum_{i=1}^{N}(X_i - X_{i-1}),\quad LY = \sum_{i=1}^{N}(Y_i - Y_{i-1})$
Средняя линейная скорость по фронтали и сагиттали ($Vx_{\text{ср}}$, $Vy_{\text{ср}}$)	Среднее значение проекции линейной скорости во фронтальной и сагиттальной плоскости	$Vx_{\text{ср}} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\frac{Vx_i}{T},\quad Vy_{\text{ср}} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\frac{Vy_i}{T}$
Разброс по фронтали и сагиттали (Q_x, Q_y)	Среднеквадратическое отклонение ЦД по фронтали и сагиттали относительно смещения	$Q_x = \sqrt{\frac{1}{N-1}\sum_{i=1}^{N}(X_i - X_{\text{ср}})^2}$ $Q_н = \sqrt{\frac{1}{N-1}\sum_{i=1}^{N}(Y_i - Y_{\text{ср}})^2}$
Площадь доверительного эллипса (S_{Sxy})	Основная часть площади, занимаемой стабилограммой без, так называемых, петель и случайных выбросов	$S_{\text{Sxy}} = 2\ln\frac{1}{1-\beta}\sqrt{D(X)D(Y) - Cov(X,Y)^2}$
Коэффициент сжатия доверительного эллипса	Отношение длины большой оси доверительного эллипса к длине малой оси	$k = \frac{\frac{D(X)+D(Y)}{2} + \sqrt{\left(\frac{(D(X)-D(Y))}{2}\right)^2 + Cov(X,Y)^2}}{\frac{D(X)+D(Y)}{2} - \sqrt{\left(\frac{(D(X)-D(Y))}{2}\right)^2 + Cov(X,Y)^2}}$
Качество функции равновесия	Траектория движения ЦД тела анализируется с применением методов векторного анализа*	Рассчитанный коэффициент интерпретируется как показатель, описывающий качество функции равновесия

X_i, Y_i – отсчеты координат ЦД во времени;
N – число отсчетов;
Vxi, Vyi – мгновенное значение вектора скорости;
T – продолжительность исследования;
β – вероятность попадания точки статокинезиограммы в эллипс ($\beta = 0.9$);
$D(X)$, $D(Y)$ – дисперсия соответствующей компоненты.
* – показатель рассчитывается в виде процентного отношения площади, ограниченной функцией распределения длин векторов скоростей, и некоторой константы, равной площади прямоугольника, ограниченного осями координат, горизонтальной асимптотой функции кривой распределения длин скоростей и вертикальной границей.

Таблица 3. Эмоциональные оценки звуковых сигналов по группе из 46 испытуемых

Шкала	Звуковой сигнал		
	женский крик	тормоз автомобиля	звонок телефона
Валентность	2 [1, 3]	3 [1, 4]	5 [3, 5]
Возбуждение	5 [3, 6]	7 [5, 8]	5 [5, 7]
Доминирование	4 [3, 5]	6 [4, 8]	7 [4, 7]

Данные представлены как медиана [нижний квартиль; верхний квартиль].

чений осуществляли с применением парного непараметрического метода Вилкоксона. Попарное сравнение показателей в ответ на разные звуковые стимулы выполняли с поправкой Бонферрони на множественные сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент 1. Эмоциональные оценки 22 звуковых сигналов, выполненные группой из 46 испытуемых, показали широкий диапазон значений для всех трех шкал из системы невербальной изобразительной оценки. Шкала валентности эмоции для большинства сигналов выявила наличие оценок у разных испытуемых в широком диапазоне баллов: от 1 до 7 для одних типов сигналов; от 1 до 9 – для других. Аналогичные результаты получили и для шкал “выраженность” и “доминирование” эмоции. Таким образом, была выявлена неоднозначность оценок группой испытуемых для многих звуковых сигналов.

Для биологически значимых и легко интерпретируемых звуковых сигналов оценки были более определенными. Звук тормоза и женский крик по “валентности” эмоции имели диапазон оценок в баллах существенно уже: от 1 до 5. Результат проверки на нормальность распределения балльных оценок этих сигналов в группе испытуемых был отрицательным. Поэтому в табл. 3 представлены результаты, демонстрирующие близкие значения эмоциональных оценок этих двух сигналов по всем трем шкалам в виде медианы и квартилей. Оба звуковых сигнала негативного эмоционального содержания были использованы для изучения постуральных ответов. Достоверные различия между испытуемыми разного пола по “валентности” эмоции не были выявлены (звуки: тормоза ($p = 0.27$), женского крика ($p = 0.99$), звонок телефона ($p = 0.91$), непараметрический критерий Манна–Уитни). Поэтому последующий анализ влияния звуков на контроль позы был проведен без разделения по полу. Вместе с тем физические параметры этих сигналов различались, прежде всего, по длительности фронта нарастания сигнала, что могло повлиять на постуральный ответ (рис. 1, табл. 1).

Для сопоставления влияния эмоциональной значимости сигнала на постуральные показатели был выбран еще один стимул, который по валентности эмоции был нейтральным и находился по средним оценкам в середине двух других шкал (табл. 3). Причем в качестве звукового стимула этот эмоционально нейтральный сигнал является повседневным и побуждающим к действию. Он имел короткий фронт нарастания, близкий с фронтом звука тормоза автомобиля (табл. 1).

Эксперимент 2. В исследовании показателей позы применяли 6 экспериментальных стоек, во время каждой из которых звучали три сигнала, отобранные на основании результатов психофизического эксперимента. Индивидуальные постуральные ответы на звуковые сигналы существенно различались по величине, латентному периоду и продолжительности. В ряде случаев наблюдали выраженную синхронизацию изменения положения ЦД по обеим осям. Примеры высокоамплитудных синхронизированных по обеим осям постуральных ответов, характер-

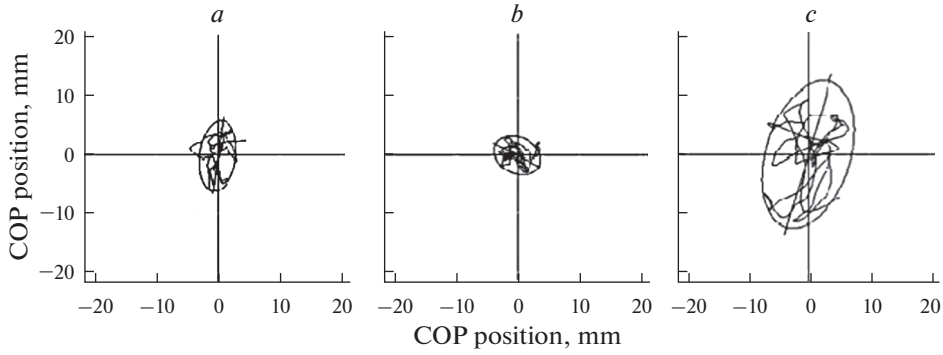


Рис. 3. Индивидуальные статокинезиограммы стоек длительностью 8 с, выполненных в тишине для испытуемых № 5 (*a*), № 2 (*b*) и № 17 (*c*).
По оси абсцисс – положение ЦД тела по фронтальной оси, мм. По оси ординат положение ЦД тела по сагиттальной оси, мм. Показан доверительный эллипс, рассчитанный за период стойки длительностью 8 с. Прямой линией показана длинная ось эллипса.

ных для испытуемых (№ 10 и 15), представлены на рис. 2. Латентность ответов можно оценить по положению отчетливо видимых на представленных стабилограммах пиков. Она составляет в большинстве случаев 2–3 с. Общая продолжительность ответа варьирует в пределах 5 с. Выбранная нами продолжительность периода анализа – 8 с, позволяла выявить высокоамплитудную компоненту ответа при кратковременном звуковом воздействии.

Показатели, рассчитанные в периоды постуральных ответов на звуковые стимулы, сопоставляли с аналогичными показателями, полученными за такие же временные периоды в контрольной стойке с закрытыми глазами в тишине. В результате испытуемые и в контрольной стойке находились в состоянии ожидания сигнала, но влияние самого звукового сигнала отсутствовало. В контрольной стойке были выявлены значительные индивидуальные различия по всем рассчитанным стабилографическим показателям. По показателю “качество равновесия” минимальное и максимальное значения в группе составили 38 и 89%, т.е. результаты отдельных испытуемых могли различаться более чем в 2 раза. По площади эллипса разница оказалась более, чем в 10 раз: минимальные/максимальные значения составили 40 и 530 мм^2. По показателю сжатие минимальные/максимальные значения были 1.2 и 3.2, т.е. различия превышали 2.5 раза. Примеры статокинезиограмм для испытуемых с выраженными индивидуальными различиями стабилографических показателей для стоек длительностью 8 с, выполненных в тишине, представлены на рис. 3.

Выявлена взаимосвязь индивидуальных значений длины траектории по двум осям (рис. 4a). Диапазон значений этого показателя по фронтальной оси составил от 20 до 118 мм, по сагиттальной – от 42 до 124 мм. Аналогичная взаимосвязь была выявлена и для показателей линейных скоростей перемещения ЦД тела по обеим осям (рис. 4b). Диапазон данных линейной скорости составил по фронтальной оси от 2.3 до 13.5 мм/с, а по сагиттальной – от 4.7 до 14.1 мм/с. Представленные данные свидетельствуют о том, что в тишине (контрольная стойка) длина траектории и производный от нее показатель – линейная скорость – сходным образом изменяются по разным осям от испытуемого к испытуемому. Следовательно, при оценке воздействия звука на постуральные показатели было необходимо нормировать изменения показателей позы с учетом описанных выше индивидуальных различий.

Индивидуальные реакции на звук также значительно варьировали по амплитуде и латентности ответов. Это касалось показателей положения ЦД тела по сагитталь-

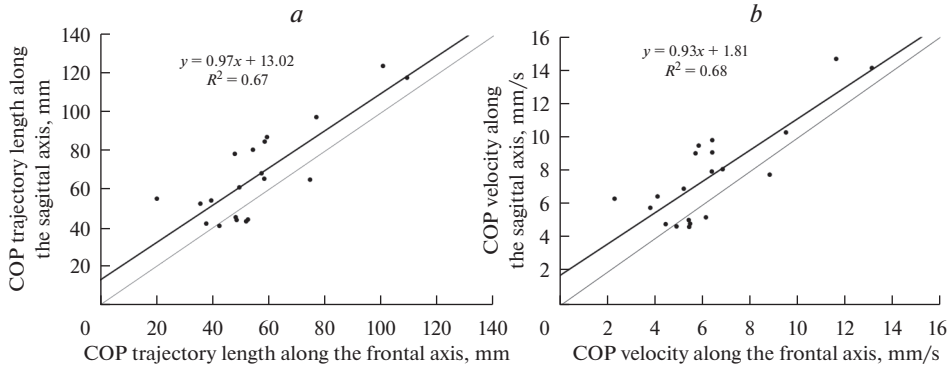


Рис. 4. Взаимосвязь индивидуальных значений длины траектории (*a*) и линейной скорости движения ЦД тела (*b*) по двум осям.

a) – по оси абсцисс – длина траектории ЦД тела по фронтальной оси, мм; по оси ординат – длина траектории ЦД тела по сагиттальной оси, мм. *b*) –по оси абсцисс – скорость ЦД тела по фронтальной оси, мм/с; по оси ординат скорость ЦД тела по сагиттальной оси, мм/с.

Жирная линия – линейная аппроксимация данных для группы испытуемых. Показаны соответствующие коэффициенты корреляции. Тонкая линия – биссектриса, на ней длины траекторий и скорости по обеим осям равны.

ной и фронтальной осям. Тем не менее, даже в отсутствие нормировки средние по группе показатели в период ответа на звук заметно отличались от контрольных значений (табл. 5). Все средние показатели, кроме показателя “качество функции равновесия” и сжатия эллипса, были выше в ответ на стимуляцию по сравнению с контролем. Показатель “качество функции равновесия” оказалось при звуковой стимуляции ниже, чем в контроле. Таким образом, при всех типах стимуляции была обнаружена тенденция к дестабилизации позы. Вместе с тем, вариабельность контрольных значений должна быть учтена при определении влияния звуковой стимуляции на позу. Относительные изменения постуральных показателей позволяют выявить влияние звука независимо от индивидуальных особенностей поддержания позы.

Сравнительный статистический анализ был выполнен для нормированных значений показателей. Нормирование индивидуальных показателей к контрольным значениям, полученным для данного испытуемого, выполняли по формуле:

$$N = P/Pc \times 100,$$

где N – нормированная величина в %, P – показатель в период ответа на звук, Pc – контрольное значение показателя.

Результаты нормирования индивидуальных показателей и их последующего усреднения по группе из 21 испытуемого представлены на рис. 5. При действии трех звуковых стимулов выявлены достоверные отличия по сравнению с контрольным условием с закрытыми глазами для восьми из девяти проанализированных стабилометрических показателей. Направление изменений было одинаковым для всех трех звуковых сигналов по фронтальной и по сагиттальной осям. По сравнению с контрольным условием получили достоверное увеличение длины траектории ЦД на 15–20% по сагиттальной оси для всех типов звуковых сигналов ($p < 0.001$). По фронтальной оси для женского крика и звонка телефона получили достоверные изменения ($p < 0.01$ и $p < 0.001$ соответственно), тогда как для звука тормоза автомобиля увеличение длины траектории происходило в виде тенденции ($p < 0.08$).

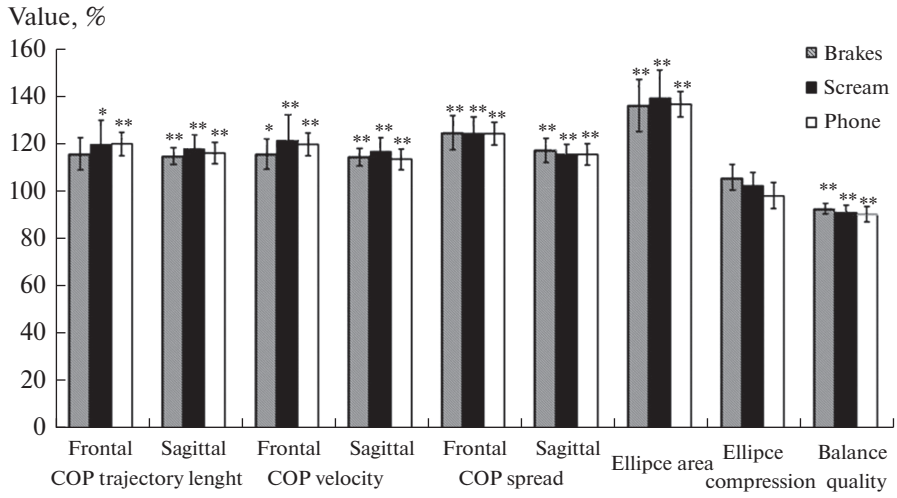


Рис. 5. Результаты нормирования индивидуальных показателей, характеризующих положение ЦД тела, и их последующего усреднения по группе из 21 испытуемого.
По оси ординат: величина показателей при прослушивании звуковых сигналов в % к показателям в контрольной стойке, принятым за 100%. По оси абсцисс: стабилометрические показатели. Достоверные отличия для сравнения условий со звуковой стимуляцией с контрольным условием: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$; непараметрический парный тест Вилкоксона.

Для показателей средней линейной скорости достоверное увеличение на 13–21% выявили для всех трех звуковых стимулов ($p < 0.003$ и $p < 0.03$ для сагиттальной и фронтальной оси соответственно). Разброс положения ЦД тела был больше относительно контрольного условия в тишине при всех звуковых стимулах: по сагиттальной оси на 15–17% ($p < 0.006$), по фронтальной оси – на 24–25% ($p < 0.007$).

Таблица 4. Средние по группе из 21 испытуемого стабилографические показатели

Стабилографический показатель	Контроль	Звуковая стимуляция		
		тормоз автомобиля	женский крик	звонок телефона
Длина траектории ЦД по фронтали, мм	59 ± 5	69 ± 9	74 ± 13**	72 ± 8**
Длина траектории ЦД по сагиттали, мм	70 ± 6	80 ± 8**	84 ± 11**	82 ± 9**
Скорость по фронтали, мм/с	6.8 ± 0.7	7.9 ± 1.1*	8.6 ± 1.6**	8.2 ± 0.9**
Скорость по сагиттали, мм/с	8.0 ± 0.7	9.2 ± 0.9**	9.7 ± 1.4**	9.2 ± 1.0*
Разброс по фронтали, мм	0.94 ± 0.09	1.18 ± 0.15*	1.20 ± 0.18**	1,17 ± 0.13**
Разброс по сагиттали, мм	1.07 ± 0.10	1.25 ± 0.14*	1.25 ± 0.16**	1.24 ± 0.15**
Площадь эллипса, мм^2	155 ± 33	225 ± 67*	265 ± 97**	229 ± 60**
Сжатие	1.88 ± 0.11	1.90 ± 0.07	1.83 ± 0.05	1.76 ± 0.07
Качество равновесия, %	73 ± 3	69 ± 4**	68 ± 4**	68 ± 4**

Достоверные отличия для сравнения условий со звуковой стимуляцией с контрольным условием: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$; непараметрический парный тест Вилкоксона. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Интегральные показатели, характеризующие равновесие тела в вертикальной стойке, также изменялись однонаправленно при действии всех звуковых стимулов. Изменения показателя площадь эллипса оказались наиболее выраженными. Его увеличение при звуковом воздействии составило 36–39% по сравнению с контрольным условием ($p < 0.01$). При этом форма эллипса осталась прежней – коэффициент сжатия достоверно не изменился, различия в средних данных не превышали 6%. Показатель "качество функции равновесия" достоверно снизился на 7–10% ($p < 0.005$).

По всем стабилометрическим показателям достоверных различий в реакции на разные типы звуковых сигналов не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Психоакустическое шкалирование, выполненное по системе невербальной изобразительной оценки [12], позволило охарактеризовать ряд часто встречающихся, а также искусственно синтезированных звуковых стимулов по знаку и выраженности эмоции. Одновременно была выполнена оценка по доминированию, т.е. личной позиции испытуемого по поводу данной эмоции. Было выявлено, что для биологически значимых и легко интерпретируемых звуковых сигналов их оценки разными испытуемыми имели близкие значения. Разделение испытуемых на группы по полу и последующая проверка на влияние этого фактора на результаты эмоциональной оценки звуковых сигналов не выявило достоверных различий. Этот результат полностью согласуется с данными работы [4].

Это позволило выбрать стимульный материал для выполнения второй части исследования. В ней были использованы два звуковых стимула негативного содержания (женский крик и звук тормоза автомобиля) и третий стимул – звонок телефона, который существенно отличался от них эмоционально нейтральным значением. Все три звуковых сигнала были существенно короче, чем продолжительность постурального ответа на стимул, и близкими по длительности. Таким образом, результаты психоакустического исследования позволили обеспечить стимуляцию, адекватную поставленной задаче – зарегистрировать постуральные ответы на одиночные короткие биологически значимые звуковые стимулы разного эмоционального содержания.

Контрольная серия постуральных стоек в тишине выявила значительную индивидуальную вариабельность показателей положения ЦД тела. Одной из причин данной вариабельности может служить обнаруженный нами ранее факт, что стратегия поддержания позы при отсутствии дистантной информации различается у людей разного когнитивного стиля [18]. В работе была показана значительная разница между группами поленезависимых и полезависимых испытуемых по большинству исследованных постуральных показателей, она проявлялась в более выраженных колебаниях тела у первых. Достоверное различие было выявлено для показателей длины траектории, скорости перемещения ЦД тела и разброса по сагиттальной оси, тогда как по фронтальной оси различия отсутствовали. Полезависимые и поленезависимые субъекты не только по-разному поддерживали равновесие в отсутствие сенсорной стимуляции, но и по-разному реагировали на звуковую информацию [19, 20]. В этих работах было показано, что при прослушивании в течение 45 с звуковой стимуляции, содержащей информацию о движении, – стабилометрические показатели, характеризующие выраженность колебаний ЦД тела, – длина траектории, средняя линейная скорость, разброс и площадь эллипса, оказались больше в группе испытуемых с поленезависимым когнитивным стилем, чем с полезависимым. В настоящем исследовании существенные индивидуальные различия в показателях также наблюдали не только в контроле, но и при формировании ответа на короткие звуковые стимулы. Этот результат подтвердил полученные ранее данные и привел к необходимости нормировки индивидуальных стабилометрических показателей при групповом анализе данных.

Регистрация положения ЦД тела в ответ на все использованные звуковые стимулы и последующий анализ стабилометрических показателей выявили относительное увеличение длины траектории перемещения ЦД, его скорости и разброса по обеим осям по сравнению с тишиной. Такие изменения характерны для дестабилизации позы [21], они свидетельствовали о подготовке к последующему движению, а не к реакции замирания, при которой должны были бы возникать противоположные изменения – снижение длины траектории и других показателей положения ЦД тела. Нам не удалось обнаружить различий между стабилометрическими показателями по обеим осям в ответах на короткие звуковые сигналы негативного и нейтрального эмоционального содержания. Зарегистрированные изменения постурального контроля в ответ на звуковые сигналы не могут являться старт-рефлексом, который представляет собой непроизвольную двигательную реакцию тела как целого на внезапный раздражитель. Старт-рефлекс обычно исследуют при интенсивности звука 120 дБ, но есть работы, где его удалось отследить при уровне звука 80 дБ. В нашей работе уровень интенсивности всех звуковых сигналов был высоким – 72 дБ УЗД, но недостаточным для формирования такого рефлекса. Помимо этого особенностью старт-рефлекса является короткая латентность ответа – в пределах 200 мс [22]. Наблюдаемая в нашей и других работах [5, 19] нестабильная величина латентности постурального ответа на сложные звуковые стимулы в 1–3 с до пикового отклонения положения ЦД оказывается на порядок больше, чем продолжительность старт-рефлекса. Таким образом, и по интенсивности стимуляции, и по временным характеристикам, и по стабильности показателей ответа эти процессы оказываются различными.

Критически важную роль для формирования реакции на звук имеет скорость его нарастания. Хорошо известно, что в слуховой системе длительность фронта нарастания звука определяет формирование ответа [23]. Поэтому нам представлялось важным выяснить, не будет ли разная скорость активации в слуховой системе проявляться в показателях позного ответа. С этой целью исследовали показатели ЦД тела в ответ на сигналы с фронтами нарастания звука, которые различаются по длительности в пять раз (женский крик и звук тормозов). Достоверных различий между показателями постуральных ответов на звуковые сигналы с разной длительностью фронта и сходным эмоциональным содержанием выявлено не было. Гипотетически постуральный ответ можно было бы интерпретировать как подготовку двигательной реакции в ответ на звук, которая подавляется инструкцией стоять неподвижно.

Примененный в работе подход, предполагающий оценку стабилометрических показателей в оптимальный временной интервал – 8 с, за который формируется постуральный ответ на короткие одиночные стимулы, оказывается устойчивым к вариабельности латентности и амплитуды ответа. Он позволяет разрешить методическую проблему, которая возникает при анализе траекторий перемещения ЦД тела на подобные стимулы, и описана в работе [5]. Изменение интегральных показателей, характеризующих равновесие тела в вертикальной стойке, было однонаправленным и близким по величине при действии всех трех звуковых стимулов. Наибольшие изменения были выявлены по показателю площадь эллипса, который является производным показателем от разброса по обеим осям, и также указывает на дестабилизацию позы. На основании полученных нами результатов при оценке эффекта воздействия коротких звуковых сигналов на позу можно применять данный постуральный показатель.

Наши данные свидетельствуют о дестабилизации позы под действием звука, тогда как в большинстве исследований звуковая стимуляция рассматривается как стабилизирующий фактор [2–4, 24]. Это принципиальное различие в результатах постуральных исследований легко объяснимо. В нашей работе применяли корот-

кие, т.е. существенно меньшие по длительности, чем постуральный ответ, звуковые стимулы. В то же время в остальных работах использовали длительные движущиеся [3] или стационарные [2, 4] пространственные слуховые сигналы, которые рассматривают как “якорные” для поддержания равновесия [25]. Анализ постуральных показателей в последних случаях выполняют в течение продолжительного времени, что не позволяет выявить ответ на начало звуковой стимуляции, который, по нашим представлениям, должен иметь дестабилизирующий характер. Отметим, что дестабилизирующий ответ на короткий движущийся звуковой образ был впервые показан в работе Агаевой с соавт. [5]. В нашем исследовании были применены короткие звуковые стимулы разного эмоционального содержания, и результат воздействия внезапного короткого звукового стимула оказался дестабилизирующим независимо от его содержания. Этот методический подход может быть использован при оценке постуральной устойчивости, а также для тренировки в реабилитационных мероприятиях.

В настоящей работе мы не ставили задачи изучения влияния воздействия звуковых сигналов из источников, различающихся положением в пространстве, на изменение положения ЦД тела. Однако, естественно предположить, что при различной локализации источника звука положение ЦД будет изменяться по-разному. В пользу такого предположения свидетельствует работа [26], в которой при прослушивании звука шагов приближающихся сзади и спереди от испытуемого, наблюдали изменение показателя смещения в противоположных направлениях: при шагах спереди испытуемые увеличивали отклонение назад, а при шагах сзади – вперед. В работе с ритмической стимуляцией [1] звук, подаваемый в течение 1 мин, переключали каждые 10 с с динамиков, расположенных спереди-сзади или слева-справа, и наблюдали увеличение колебаний тела в сагиттальной плоскости в первом случае и во фронтальной – во втором. Используя разную локализацию источника звука и короткие сигналы, по-видимому, можно достичь кратковременной дестабилизации позы со смещением среднего положения ЦД тела в заданном направлении.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами государственного бюджета по госзаданию (тема № 075-0152-22-00).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И.Г.А., О.П.Т.), сбор данных (О.П.Т.), обработка данных (О.П.Т.), написание и редактирование манускрипта (И.Г.А., О.П.Т.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи выражают благодарность сотрудникам Лаборатории физиологии движения Института физиологии им. И.П. Павлова за предоставленную возможность выполнить работу на стабилографе “Стабилан 01”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Soames RW, Raper SA* (1992) The influence of moving auditory fields on postural sway behaviour in man. Eur J Appl Physiol 65: 241—245.
https://doi.org/10.1007/BF00705088
2. *Zhong X, Yost WA* (2013) Relationship between postural stability and spatial hearing. J Am Acad Audiol 24: 782—788.
https://doi.org/10.3766/jaaa.24.9.3
3. *Gandemer L, Parseihian G, Kronland-Martinet R, Bourdin C* (2014) The influence of horizontally rotating sound on standing balance. Exp Brain Res 232: 3813—3820.
https://doi.org/10.1007/s00221-014-4066-y
4. *Siedlecka B, Sobera M, Sikora A, Drzewowska I* (2015) The influence of sounds on posture control. Acta Bioeng Biomech 17: 95—102.
https://doi.org/DOI:10.5277/ABB-00150-2014-03
5. *Agaeva MY, Al'tman YA, Kirillova IY* (2006) Effects of a sound source moving in a vertical plane on postural responses in humans. Neurosci Behav Physiol 36: 773—780.
https://doi.org/10.1007/s11055-006-0087-8
6. *Chen X, Qu X* (2016) Influence of affective auditory stimuli on balance control during static stance. Ergonomics 60: 404—409.
https://doi.org/10.1080/00140139.2016.1182649
7. *Lelard T, Stins J, Mouras H* (2019) Postural responses to emotional visual stimuli Neurophysiol Clin 49: 109—114.
https://doi.org/10.1016/j.neucli.2019.01.005
8. *Azevedo TM, Volchan E, Imbiriba LA, Rodrigues EC, Oliveira JM, Oliveira LF, Lutterbach LG, Vargas CD* (2005) A freezing-like posture to pictures of mutilation. Psychophysiol 42: 255—260.
https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2005.00287
9. *Stins JF, Beek PJ* (2007) Effects of affective picture viewing on postural control. BMC Neurosci 8: 83.
https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-83
10. *Eerland A, Guadalupe TM, Franken IH, Zwaan RA* (2012) Posture as index for approach-avoidance behavior. PLoS One 7: e31291.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031291
11. *Lelard T, Krystkowiak P, Montalan B, Longin E, Bucchioni G, Ahmaidi S, Godefroy O, Mouras H* (2014) Influence of postural threat on postural responses to aversive visual stimuli. Behav Brain Res 266: 137—145.
https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.051
12. *Lang PJ* (1980) Behavioral treatment and bio-behavioral assessment: Computer applications. 119—137. In: *Sidowski JB, Johnson JH, Williams TA* (eds) Technology in mental health care delivery Ablex Publishing. New York. USA.
13. *Bradley M, Lang P* (2007) The International Affective Picture System (IAPS) in the study of emotion and attention. 29-46. In: Handbook of Emotion Elicitation and Assessment; Series in Affective Science; *Coan JA, Allen JJB*, (eds) Oxford Univer Press. New York. USA.
14. *Yang W, Makita K, Nakao T, Kanayama N, Machizawa MG, Sasaoka T, Sugata A, Kobayashi R, Hiramoto R, Yamawaki S, Iwanaga M, Miyatani M* (2018) Affective auditory stimulus database: An expanded version of the International Affective Digitized Sounds (IADS-E). Behav Res Methods 50: 1415—1429.
https://doi.org/10.3758/s13428-018-1027-6
15. *Keith RW* (2000) Development and standardization of SCAN-C test for auditory processing disorders in children. J Am Acad Audiol 11: 438—445.
16. *Бабанов НД, Каленова АА, Серченко ЯА, Гроховский СС, Кубряк ОВ* (2019) Стандартизация, взаимозаменяемость и анализ предложений стабилоплатформ в России. Пробл стандартизации в здравоохран (9-10): 10-17. [*Babanov ND, Kalenova AA, Serchenko YaA, Grohovskij SS, Kubryak OV* (2019) Standartizaciya, vzaimozamenyaemost i analiz predlozhenij stabiloplatform v Rossii. Probl standartizacii v zdravoohran (9—10): 10—17. (In Russ)].
https://doi.org/10.26347/1607-2502201909-10010-017
17. Руководство пользователя "Стабилан-01". Программно-методическое обеспечение компьютерного стабилометрического комплекса StabMed 2 (2004) Таганрог. ЗАО ОКБ Ритм. [Rukovodstvo pol'zovatelya "Stabilan-01". Programmno-metodicheskoe obespechenie komp'yuternogo stabilometricheskogo kompleksa StabMed 2 (2004) Taganrog ZAO OKB Ritm 2004. (In Russ)].
18. *Timofeeva OP, Andreeva IG* (2021) Postural control features of field-dependent and field-independent subjects in the absence of visual and audio information. Human Physiol 47: 374—381.
https://doi.org/10.1134/S0362119721040150
19. *Andreeva IG, Gvozdeva AP, Bobrova EV, Gerasimenko YP* (2018) Differences in the postural responses to approaching and receding sound images in subjects with different perceptual styles.

Dokl Biol Sci 482: 6178–6181.
https://doi.org/10.1134/S0012496618050125
20. *Тимофеева ОП, Івоздева АП, Боброва ЕВ, Андреева ИГ* (2020) Постуральные колебания у людей с разным когнитивным стилем при ожидании слуховой информации о движении. Журн высш нерв деят им ИП Павлова 70(6): 752–762. [*Timofeeva OP, Gvozdeva AP, Bobrova EV, Andreeva IG* (2020) Postural fluctuations in people with different cognitive styles when waiting for auditory information about movement. J Higher Nerv Activity IP Pavlova 70(6): 752–762. (In Russ)].
https://doi.org/10.31857/S0044467720060106
21. *Mainenti MRM, De Oliveira LF, De Melo Tavares De Lima M, Nadal J* (2007) Stabilometric signal analysis in tests with sound stimuli. Exp Brain Res 181(2): 229–236.
https://doi.org/10.1007/s00221-007-0921-4
22. *Nonnekes J, Carpenter MG, Inglis JT, Duysens J, Weerdesteyn V* (2015) What startles tell us about control of posture and gait. Neurosci Biobehav Rev 53: 131–138.
https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.002
23. *Радионова ЕА* (1971) Функциональная характеристика нейронов кохлеарных ядер и слуховая функция. Л Наука. [Radionova EA (1971) Functional characteristics of cochlear nuclei neurons and auditory function. L Nauka. (In Russ)].
24. *Stevens MN, Barbour DL, Gronski MP, Hullar TE* (2016) Auditory contributions to maintaining balance. J Vestib Res 26: 433–438.
https://doi.org/10.3233/VES-160599
25. *Lubetzky AV, Gospodarek M, Arie L, Kelly J, Roginska A, Cosetti M* (2020) Auditory Input and Postural Control in Adults: A Narrative Review. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg 146: 480–487.
https://doi.org/10.1001/jamaoto.2020.0032
26. *Timofeeva OP, Andreeva IG, Gvozdeva AP* (2021) Dynamics of Postural Indices in Case of Listening to Sounds of Steps Approaching from the Front and from Behind. J Evol Biochem Physiol 57: 1522–1532.
https://doi.org/10.1134/S0022093021060284

Human Postural Responses to Single Sound Signals with Different Emotional Content

O. P. Timofeeva[a] and I. G. Andreeva[a, *]

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

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

The listening of biologically significant sound information leads to involuntary postural preparation for the subsequent motor response. In this work, postural indicators characterizing changes in the human vertical posture in response to single short biologically significant sound stimuli are investigated. In the first part of the work, a psychoacoustic experiment was performed using the International Affective Picture System in group of 46 subjects. According to its results, three sound stimuli with the duration of about 1 second were selected: two with negative content (a woman's scream and the sound of a car brake) and one with emotionally neutral stimulus – a phone call. In the second part of the work, the center of the pressure (CoP) of the body was recorded in response to the three stimuli in a group of 21 subjects. Analysis of the data within 8 seconds after the start of the stimulus (the time of the postural response) revealed a increase in the following stabilometric indicators compared to silence: the CoP trajectory length, COP average linear velocity and the spread along the frontal and sagittal axes, the area of the confidence ellipse. This method proved to be resistant to the variability of latency and amplitude of the postural response. According to the results obtained, short sounds that were with duration less than ones of the postural response, led to a short-term slight destabilization of the pose regardless of their emotional content. The area of the confidence ellipse has the largest changes in comparison with the other indicators up to 36–39% according to the average data for different stimuli.

Keywords: balance control, affective auditory stimuli, center of pressure, destabilising influence

EDN: VDKGFN
РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2022, том 108, № 8, с. 1058–1066

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ (2022 г.)

DOI: 10.31857/S0869813922080106

Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова (ISSNp: 0869-8139, ISSNe: 2658-655X) – рецензируемый научный журнал Российской академии наук, основан в 1917 г. Журнал выходит ежемесячно и публикует работы по всем разделам физиологии и физиологическим аспектам смежных наук – зоологии, анатомии, гистологии, эмбриологии, молекулярной биологии, биохимии. Материалы могут быть представлены в виде экспериментальных, методических или обзорных статей. Опубликованные статьи на русском языке находятся в свободном доступе.

Все статьи переводятся на английский язык редакцией (или самими авторами) и публикуются в Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology (ISSNp: 0022-0930, ISSNe: 1608-3202), индексируемого в WoS (**импакт-фактор за 2021 г. – 1.621**).

Правила для авторов Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова составлены с учетом “Единых требований к рукописям для биомедицинских журналов” (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors), а также на основе руководства ARRIVE по разработке, анализу и представлению научных исследований, выполненных на животных.

Подача статей производится в электронном виде на сайте журнала https://rusjphysiol.org/index.php/rusjphysiol/submission/wizard

При подаче статьи авторы гарантируют следующее:

• материалы не были опубликованы ранее и не рассматриваются в других изданиях;

• авторы знают и соблюдают этические нормы, предписанные международными соглашениями о публикациях научных статей;

• при выполнении работ авторы соблюдали международные правила проведения исследований с участием человека и/или животных;

• текст статьи одобрен всеми авторами перед подачей в редакцию, каждый соавтор согласен на авторство в данной статье, вклад каждого соавтора в статью указан;

• авторами представлена полная информация о потенциальных конфликтах интересов.

СТРУКТУРА РУКОПИСИ

Рукопись должна быть построена следующим образом: 1) заглавие; 2) инициалы и фамилии авторов; 3) полные названия учреждений, город, страна; 4) электронная почта автора для переписки; 5) резюме на русском языке; 6) ключевые слова; 7) текст статьи, включающий таблицы, рисунки и подписи к рисункам в нужных местах; 8) источники финансирования; 9) информация о потенциальных конфликтах интересов; 10) вклад авторов; 11) список цитированной литературы; 12) заглавие на английском языке; 13) инициалы и фамилии авторов на английском языке; 14) полные названия учреждений, город, страна, на английском языке; 15) электронная почта автора для переписки; 16) резюме на английском языке;

17) ключевые слова на английском языке; 18) раздел для переводчика (перевод специальных терминов, подписей к рисункам и таблиц); 19) информация об авторах.

При написании рукописи редакция рекомендует использовать **файл-шаблон** статьи, который можно скачать с сайта журнала из раздела для авторов.

ОСНОВНЫЕ РАЗДЕЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СТАТЬИ

Резюме (рекомендуемый объем 200–250 слов). Резюме должно отражать основное содержание статьи и следовать логике описания результатов в статье. По желанию авторов резюме может быть разбито на те же разделы, что и статья (введение, методы, результаты, обсуждение). Обязательно должны быть приведены латинские названия видов исследованных животных (за исключением лабораторных животных). Если изучался один вид животных, то его латинское или русское название указывается в заголовке статьи.

Ключевые слова (обычно не более 5–7 слов или словосочетаний в единственном числе).

Введение содержит постановку и актуальность проблемы, краткое изложение истории проблемы с обязательным обзором работ, в которых аналогичные или близкие исследования уже проводились. Следует избегать ссылок на общеизвестные закономерности (учебники) и множественных ссылок на один тезис. Завершается введение четкой формулировкой цели и задач исследования, из которых читателю будет понятна научная новизна исследований.

Методы исследования должны быть описаны таким образом, чтобы можно было воспроизвести эксперименты. В этом разделе должна быть информация об испытуемых или использованных в работе животных, материалах, реактивах и приборах с указанием фирм и стран-производителей. Необходимо также описать методы статистической обработки результатов. При использовании множественных сравнений предпочтение следует отдавать дисперсионному анализу перед попарным сравнением с помощью критерия Стьюдента.

Если работа выполнена на животных, то в методике должно быть сделано указание о соблюдении биоэтических норм: “Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям [название биоэтического комитета организации], номер и дата протокола”.

При публикации результатов исследований с участием людей следует указать “Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие”. Необходимо привести номер и дату протокола (био)этического комитета организации, в котором было одобрено проведение данного исследования.

Работы, в которых не гарантируется соблюдение биоэтических принципов, не принимаются к рассмотрению. В некоторых случаях редакция может запросить авторов или организацию, в которой выполнялось исследование, предоставить копию протокола этического комитета.

Результаты исследования должны давать полное представление о полученных фактических данных и содержать материалы, характеризующие их достоверность. Этот раздел должен быть иллюстрирован рисунками и/или таблицами. Не следует дублировать информацию, содержащуюся в тексте, таблицах и рисунках. Следует отдавать предпочтение графическому представлению данных перед табличным. Результаты должны быть статистически обработаны, содержать информацию о

числе наблюдений, средних значениях показателей и их вариативности, использованных статистических критериях.

В тексте статьи и таблицах приводите только необходимое число значащих цифр для полученных результатов (обычно это 2 или 3 цифры в зависимости от величины погрешности; число разрядов должно совпадать у среднего и погрешности). Избегайте чисел с большим количеством разрядов, для этого переводите миллисекунды в секунды, микрограммы в миллиграммы и т.п. В числах десятичные знаки надо отделять точкой, а не запятой.

Неправильно:	*Правильно:*
5,437 ± 0,502	5.4 ± 0.5
3523.1 ± 365.7 мс	3.5 ± 0.4 с
0.12345 ± 0.01274	0.123 ± 0.013

Уровень вероятности указывайте, исходя из следующих правил:

- При $0.01 \leq p \leq 1.00$ – указывайте p с точностью до сотых (допустимо писать $p > 0.05$; $p < 0.05$);
- При $0.001 \leq p < 0.01$ – пишите $p < 0.01$;
- При любых $p < 0.001$ – пишите $p < 0.001$.

Значение *p*, рассчитанное статистической программой	Как привести значение *p* в статье
$p = 0.13725$	$p = 0.14$
$p = 0.0312$	$p = 0.03$ или $p < 0.05$
$p = 0.0014782$	$p < 0.01$
$p = 0.0000478$	$p < 0.001$

Для облегчения рецензирования рисунки и таблицы со всеми подписями следует размещать непосредственно в тексте статьи в необходимых местах.

Раздел **Обсуждение результатов** должен содержать интерпретацию результатов, объяснение физиологической значимости выявленных механизмов. При обсуждении собственных результатов основной акцент необходимо делать на релевантные работы, вышедшие за последние 5–10 лет. Основные результаты работы могут быть проиллюстрированы обобщающей схемой, которая будет дополнительно помещена на сайте журнала.

В разделе **Источники финансирования** указываются гранты или иные финансовые источники, при поддержке которых было выполнено исследование. Примеры: “Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № XX-XX-XXXX-а)”. “Работа выполнялась в рамках программы исследований XXXX, запланированных в Университете XXXX”. “Автор X.X.X. поддержан грантом XXXX Министерства XXXX”.

В разделе **Конфликт интересов** авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи. Конфликтом интересов может считаться любая ситуация (финансовые отношения, служба или работа в учреждениях, имеющих финансовый или политический интерес к публикуемым материалам, должностные обязанности и др.), способная повлиять на автора рукописи и привести к сокрытию, искажению данных, или изменить их трактовку. Пример: “Автор X.X.X. Владеет акциями Компании Y, которая упомянута в статье. Автор Y.Y.Y. – член комитета XXXX”.

Наличие конфликта интересов у одного или нескольких авторов не является поводом для отказа в публикации статьи. Напротив, выявленное редакцией сокрытие потенциальных и явных конфликтов интересов со стороны авторов может стать причиной отказа в рассмотрении и публикации рукописи. В случае отсутствия конфликта интересов авторы могут использовать следующий текст “Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи”.

В *обязательном* разделе **Вклад авторов** указываются конкретные этапы работ, осуществленные каждым автором (например, “Идея работы и планирование эксперимента (Авторы А.А.А. и Б.Б.Б.), сбор данных (Б.Б.Б., В.В.В., Г.Г.Г.), обработка данных (Б.Б.Б., В.В.В.), написание и редактирование манускрипта (А.А.А., Б.Б.Б., В.В.В., Г.Г.Г.)”.

Обращаем ваше внимание, что необходимо соблюдать рекомендации ICMJE. Авторами публикации могут выступать только лица, которые внесли значительный вклад в формирование замысла работы, разработку, исполнение или интерпретацию представленного исследования. Все те, кто внес значительный вклад, должны быть обозначены как Соавторы. В соответствии с рекомендациями ICMJE редакция выделяет 4 обязательных критерия, на основании которых человек включается в состав авторского коллектива:

1. существенный вклад в разработку концепции или дизайна работы; или в получение, анализ или интерпретацию данных для работы;

2. участие в написании или редактировании статьи с внесением существенного интеллектуального вклада;

3. одобрение финальной версии статьи, подлежащей публикации;

4. согласие нести ответственность за все аспекты работы, а также гарантия того, что все вопросы по достоверности и надежности любой части работы надлежащим образом проанализированы и решены.

В тех случаях, когда участники исследования внесли существенный вклад по определенному направлению в исследовательском проекте, но не соответствуют всем четырем критериям, они должны быть указаны как лица, внесшие значительный вклад в данное исследование в разделе “Благодарности”.

В статье может быть выделен раздел **Благодарности,** где приводятся сведения о лицах, способствовавших проведению работы.

Список литературы. Список литературы составляется только по цитированным в тексте работам. Правила цитирования и оформления списка литературы даны в специальном разделе.

Информация об авторах. Полностью указываются фамилии, имена и отчества всех соавторов, ученые степени и звания, места работы, электронные адреса. Можно привести ORCID.

В разделе для переводчика на английском языке должны быть ОБЯЗАТЕЛЬНО представлены все перечисленные ниже пункты: 1) заглавие; 2) инициалы и фамилии авторов; 3) полные названия учреждений, город, страна; 4) служебный адрес и электронная почта автора для переписки; 5) резюме; 6) ключевые слова; 7) список используемых специальных терминов, химической и биохимической номенклатуры, реактивов, используемых аббревиатур по-русски и по-английски; 8) подписи к рисункам и таблицы на английском языке.

ТРЕБОВАНИЯ К ОБЗОРНОЙ СТАТЬЕ

В обзорной статье не выделяют главы Методы исследования, Результаты исследования, Обсуждение результатов. Текст обзора подразделяется на основе смысловых блоков. Во введении авторы должны сформулировать, в чем новизна представ-

ленного обзора и какие задачи они ставят в рамках данного обзора. Основной акцент в статье должен быть сделан на критическом рассмотрении экспериментальных работ, опубликованных в последние 5–10 лет, поэтому большая часть цитируемой литературы должна относиться к этому периоду (более 50–70%). Редакция отдает предпочтение полноценным, всесторонним обзорам по проблеме, рекомендуемый объем текста 5–8 тыс. слов (без учета списка литературы).

Избыточные исторические экскурсы, пересказ ранее опубликованных обзоров не приветствуются. Следует приводить только необходимые ссылки, каждый тезис должен подкрепляться 1–3 ссылками, цитирование по типу [1–10] не рекомендуется.

В обзорной статье как правило должно присутствовать заключение, содержащее авторскую оценку ближайших перспективах изучения данной проблемы.

Редакция настоятельно рекомендует сопровождать обзоры иллюстративным материалом: схемами, объясняющими основные закономерности, таблицами, систематизирующими экспериментальные данные и т.д.

Обзоры авторов, не имеющих экспериментальных работ в данной области, редакцией не рассматриваются.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ИЛЛЮСТРАЦИЙ И ТАБЛИЦ

При подаче статьи для облегчения рецензирования редакция рекомендует авторам размещать все таблицы и рисунки с подписями в тексте статьи в нужных местах. В статье должна использоваться последовательная нумерация рисунков (таблиц) по ходу упоминания, на каждый рисунок или таблицу обязательно должна быть ссылка в тексте.

Технические требования к подготовке электронных файлов иллюстраций подробно изложены на сайте издательства Pleiades Publishing (House Style Guide).

Рисунки. Все обозначения на рисунках должны приводиться на английском языке в едином стиле (Times New Roman). Независимо от типа графики, рисунок должен обладать высоким реальным разрешением. Линии на рисунках/графиках должны быть не менее 0.3 пунктов (point) в толщину. Следует избегать слишком мелких обозначений (букв, цифр, значков). В тексте статьи подписи к рисункам приводятся на русском языке. Там, где необходимо дается перевод обозначений, используемых на самом рисунке. В конце статьи в разделе для переводчика дается англоязычный вариант перевода подписей к рисункам.

Все графики должны содержать обозначения координатных осей (измеряемый параметр и единицы измерения), а также кривых и других деталей на английском языке. Надписи по осям выполняются вдоль осей шрифтом Times New Roman с заглавной буквы, единица измерения отделяется запятой, а не скобками (например, Stimulation current, μA). Части рисунков обозначаются латинскими строчными буквами (a), (b), а ссылки на них по тексту статьи “рис. 1a”, “рис. 1b”.

Составные иллюстрации следует вставлять в текст как единый рисунок (из файлов jpeg или tiff), а не переносить составные части из приложений (Excel, Origin и др.). Подпись к рисунку должна содержать номер рисунка, название рисунка, подписи ко всем составным частям и расшифровку буквенных, цифровых и графических обозначений на нем. Необходимо загрузить на сайт рисунки с разрешением от 300 dpi отдельными файлами (Fig1.tiff; Fig2.jpeg).

Цветные иллюстрации рекомендуется использовать только там, где это необходимо для полноценной передачи информации, например, для гистологических микрофотографий. Необходимые цветные иллюстрации печатаются бесплатно.

Таблицы. Заголовок таблицы должен иметь номер и название, все строки и столбцы должны быть озаглавлены. Сноски должны располагаться в строке примечания внизу таблицы. Таблицы готовятся с использованием средств редактирова-

ния таблиц MS Word, вставлять таблицы как рисунок нельзя. В тексте статьи таблицы приводятся на русском языке, в конце статьи в разделе для переводчика дается англоязычный вариант таблиц.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ССЫЛОК И СПИСКА ЛИТЕРАТУРЫ

Редакция *настоятельно рекомендует* ссылаться на англоязычные работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в основных международных базах данных (Pubmed, Web of Science, Scopus). При цитировании переводных источников рекомендуется ссылаться на англоязычную версию. При цитировании публикаций в российских журналах, имеющих переводную версию, следует ссылаться исключительно на англоязычную версию.

Редакция *не рекомендует* ссылаться на локальные журналы и вестники, диссертации, авторефераты диссертаций, тезисы докладов, учебники, статьи в печати, устные сообщения. Редакция также *не приветствует* избыточное самоцитирование (>15–20%).

Для правильного оформления ссылок редакция советует использовать программы Mendeley, EndNote или их аналоги. Ссылки на литературу оформляются согласно стилю Springer – Basic (numeric, brackets, no “et al.”). Стилевой файл для Mendeley можно скачать с сайта по ссылке https://csl.mendeley.com/styleInfo/?styleId=http%3A%2F%2Fwww.zotero.org%2Fstyles%2Fspringer-basic-brackets-no-et-al

В тексте ссылки даются в квадратных скобках. Например: [1], [2–4], [1, 3–5]. Приводите только самые необходимые ссылки, множественных ссылок по типу [1–7] следует избегать.

В списке литературы ссылки приводятся в порядке цитирования.

1. *Ying C, Ying L, Yanxia L, Le W, Lili C* (2020) High mobility group box 1 antibody represses autophagy and alleviates hippocampus damage in pilocarpine-induced mouse epilepsy model. Acta Histochem 122: 151485. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.151485

2. *Evans CE, Thomas RS, Freeman TJ, Hvoslef-Eide M, Good MA, Kidd EJ* (2019) Selective reduction of APP-BACE1 activity improves memory via NMDA-NR2B receptor-mediated mechanisms in aged PDAPP mice. Neurobiol Aging 75: 136–149. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.11.011

3. *Löscher W* (2020) The holy grail of epilepsy prevention: Preclinical approaches to antiepileptogenic treatments. Neuropharmacology 167: 107605. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.04.011

4. *Peng L, Zhu M, Yang Y, Weng Y, Zou W, Zhu X, Guo Q, Zhong T* (2019) Neonatal Lipopolysaccharide Challenge Induces Long-lasting Spatial Cognitive Impairment and Dysregulation of Hippocampal Histone Acetylation in Mice. Neuroscience 398: 76–87. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.001

При оформлении ссылок на русскоязычные источники, не имеющие полного перевода, информация должна быть дублирована на английский язык и оформлена в квадратных скобках. Приводится **перевод** названия статьи, а также **транслитерация** названия журнала. Если ссылка на книгу, то приводится Издательство, город: Nauka, M / Springer, Boston. Для транслитерации текста в соответствии со стандартом BGN можно воспользоваться ссылкой http://ru.translit.ru/?account=bgn.

Пример оформления ссылок на российские издания:

1. *Крылов ВВ* (ред) (2019) Хирургия сложных аневризм головного мозга. АБВ-пресс, М. [*Krylov VV* (ed) (2019) Surgery of complex brain aneurysms. ABV-press, M. (In Russ)].

ЛИЦЕНЗИОННЫЙ ДОГОВОР

К рассмотрению принимаются только статьи, к которым приложен лицензионный договор. Шаблон договора можно скачать на сайте журнала в разделе для авторов. Договор, подписанный и заполненный всеми авторами, необходимо загрузить как pdf-файлы при подаче статьи. С 2022 г. все статьи переводятся в Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, поэтому при подаче материалов необходимо также заполнить лицензионный договор для печати переводной версии статьи.

ПОДАЧА МАТЕРИАЛОВ НА САЙТЕ

Подача рукописи осуществляется только в электронном виде на сайте журнала. Справочный файл-помощник работы на сайте можно скачать в разделе для авторов. Перед подачей статьи Вам надо подготовить следующие файлы:

1. Текст рукописи вместе с рисунками и таблицами (Manuscript.doc или docx).

2. Подписанный всеми авторами лицензионный договор для РФЖ и Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology (в формате *.pdf).

3. Файлы рисунков (Fig1.tiff; Fig2.jpeg) с разрешением не менее 300 dpi.

4. Сопроводительное письмо редактору, в котором можно порекомендовать (или отклонить) 2–4 возможных рецензентов для своей статьи, избегая конфликта интересов. Потенциальный рецензент не должен работать в том же учреждении, что и авторы статьи, у авторов и рецензента не должно быть совместных работ за последние 3 года. У рецензента должны быть опубликованные статьи в ведущих международных журналах в данной области. Следует указать фамилию, имя, отчество возможного рецензента, его место работы и электронный адрес, ссылку на его профиль в Scopus или другой базе. Статья не будет послана отклоненным рецензентам, однако выбор конкретных рецензентов для статьи остается за редактором.

Автору, осуществляющему подачу рукописи, необходимо будет заполнить на сайте основные сведения о статье и всех соавторах, внести их действующие адреса электронной почты.

ПОРЯДОК РАССМОТРЕНИЯ СТАТЬИ

После подачи рукописи через сайт автор получит автоматическое письмо на указанный при регистрации электронный адрес с уведомлением о получении редакцией статьи. Сначала сотрудник редакции проверит статью на предмет соблюдения правил оформления рукописей и выполнения этических требований. Рукопись при поступлении проверяется программой Антиплагиат. Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам на доработку без рецензирования.

На следующем этапе рукописи будут оценены редактором на предмет соответствия тематике журнала и качества представленных материалов. При несоответствии рукописи тематике журнала или ее недостаточном качестве редактор может отклонить рукопись без рецензирования.

После прохождения первичного скрининга рукопись будет направлена на рецензирование как минимум двум рецензентам. При получении противоречивых комментариев от рецензентов статья по решению редактора может быть отправлена на дополнительное рецензирование. Комментарии рецензентов и решение редактора по поводу статьи будут посланы автору через сайт и по электронной почте, поэтому важно указывать электронную почту, которую автор регулярно проверяет. Комментарии рецензентов будут также доступны через сайт в личном кабинете автора.

По результатам рецензирования редактор принимает одно из четырех решений:

1) принять статью к публикации в настоящем виде;

2) принять статью с учетом устранения небольших замечаний;

3) отправить статью на доработку и повторное рецензирование;

4) отклонить статью.

Для доработки статьи авторам дается до двух месяцев, для устранения небольших замечаний до двух недель. При необходимости выполнения дополнительных экспериментов *авторы вправе попросить редактора увеличить срок доработки статьи,* и срок доработки статьи будет продлен.

Ответы на вопросы рецензентов (отдельным файлом) и исправленная версия статьи с выделенными в тексте изменениями подаются через сайт в разделе рецензирование/версии.

Авторы должны ответить на все замечания и вопросы рецензентов и редактора. Если с какими-то замечаниями/предложениями авторы не согласны и хотят оставить первоначальный вариант, то они должны обосновать свою позицию. Если авторы игнорируют какие-то замечания/вопросы рецензента, то редактор вправе отклонить статью на этом этапе.

Если ответы авторов не поступают в установленный срок, то статья считается снятой с рассмотрения по инициативе авторов.

Доработанная версия статьи после исправления существенных замечаний посылается тем же рецензентам. Если к доработанной авторами версии статьи у рецензентов остаются обоснованные существенные замечания, то статья на этом этапе обычно отклоняется редактором. В случае позитивных рецензий статья принимается к публикации в представленном виде или с учетом устранения небольших замечаний. О принятии (или отклонении) статьи к публикации автор сразу же информируется по электронной почте.

После принятия статьи в печать в ней не допускается изменений в составе авторского коллектива, существенных изменений рисунков или текста, кроме исправления грамматических ошибок и стилевых неточностей. Если необходимы существенные изменения в корректуре, то статья должна быть отозвана авторами.

ЭТИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ

1. *Достоверность результатов.* Авторы статьи должны предоставлять достоверные результаты проделанной работы и объективное обсуждение значимости исследования. Работа должна содержать достаточно деталей и библиографических ссылок для возможного воспроизведения. Ложные или заведомо ошибочные утверждения воспринимаются как неэтичное поведение и неприемлемы.

2. *Доступ к данным и их хранение.* У Авторов могут быть запрошены необработанные данные, имеющие отношение к рукописи, для рецензирования Редакторами. Авторы должны быть готовы предоставить открытый доступ к такого рода информации (согласно ALPSP-STM Statement on Data and Databases), если это осуществимо. В любом случае авторы должны быть готовы сохранять эти данные в течение адекватного периода времени после публикации.

3. *Оригинальность и плагиат, множественность, избыточность и одновременность публикаций.*

3.1. Авторы должны удостовериться, что представлена полностью оригинальная работа и в случае использования работ или утверждений других Авторов должны предоставлять соответствующие библиографические ссылки или выдержки.

3.2. Плагиат может существовать во многих формах, от представления чужой работы как авторской до копирования или перефразирования существенных частей чужих работ (без указания авторства) и до заявления собственных прав на результаты чужих исследований. Плагиат во всех формах представляет собой неэтичные действия и неприемлем.

3.3. В общем случае Автор не должен публиковать рукопись, по большей части посвященную одному и тому же исследованию, более чем в одном журнале как оригинальную публикацию. Представление одной и той же рукописи одновременно более чем в один журнал воспринимается как неэтичное поведение и неприемлемо.

3.4. Редакция может проверить рукопись с помощью автоматизированных систем выявления заимствований (система “Антиплагиат” или аналоги). Допускается заимствование в разделе “Методы исследования” до 30–40% для постоянно используемых методик. Недопустимы существенные заимствования (>15–20%) в разделах Введение, Результаты исследования, Обсуждение результатов.

3.5. Если Редактор получит достоверные сведения о наличии плагиата или множественности публикаций одного материала после выхода статьи в Журнале, то он обязан начать процесс скорейшего изъятия публикации из Журнала и реферативных баз данных.

4. *Существенные ошибки в опубликованных работах.* В случае обнаружения Автором существенных ошибок или неточностей в публикации, Автор должен сообщить об этом Редактору Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова и взаимодействовать с Редактором с целью скорейшего изъятия публикации или исправления ошибок. Если Редактор или Издатель получили сведения от третьей стороны о том, что публикация содержит существенные ошибки, то Автор обязан изъять работу или исправить ошибки в максимально короткие сроки.