

## СОДЕРЖАНИЕ

---

### Обзорные статьи

- Модели черепно-мозговой травмы у зебрании (*Zebrafish, Danio rerio*)  
*В. Я. Бабченко, А. С. Белова, А. А. Баширзаде, М. А. Тихонова, К. А. Демин,  
К. Н. Забегалов, Е. В. Петерсен, А. В. Калугев, Т. Г. Амстиславская* 1059
- Лимфангиогенез и особенности лимфатического дренажа в различных органах.  
Значение для судьбы трансплантата  
*М. Н. Панькова, Г. И. Лобов* 1077
- 

### Экспериментальные статьи

- Антагонист грелина [D-Lys3]-GHRP-6 снижает проявления поведения риска  
в модели игровой зависимости у крыс, изменяя обмен дофамина и серотонина  
*А. А. Лебедев, И. В. Карпова, Е. Р. Бычков, Н. Д. Якушина, И. Ю. Тиссен,  
К. Е. Грамота, Н. С. Ефимов, П. Д. Шабанов* 1100
- Возрастная динамика процессов зрительного прайминга  
*Л. В. Черенкова, Л. В. Соколова* 1112
- Ингибирование ГАМК-трансаминазы и ГАМК-транспортеров  
в головном мозге с помощью вигабатрина и тиагабина ослабляет развитие  
судорог у крыс при дыхании гипербарическим кислородом  
*И. Т. Демченко, С. Ю. Жилев, Т. Ф. Платонова,  
О. С. Алексеева, Е. Р. Никитина* 1126
- Влияние нефрэктомии на реактивность артерий спонтанно  
гипертензивных крыс  
*В. Н. Ярцев* 1138
- Изменение вклада  $K_{ATP}$ -каналов в поддержание базального тонуса и дилатацию  
пиальных артериальных сосудов крыс после ишемии  
*О. П. Горшкова, И. Б. Соколова* 1150
- Влияние различных режимов физических нагрузок на состояние системы  
гемостаза и концентрацию белка ирисина в эксперименте  
*Ю. А. Бондарчук, И. И. Шахматов, И. Н. Манаева, В. М. Раевских,  
П. С. Маршалкина, Д. А. Проконец* 1162
- Особенности моторного контроля здоровых добровольцев  
в пассивном экзоскелете нижних конечностей  
*Н. Д. Бабанов, О. В. Кубряк, И. В. Меркурьев, И. А. Орлов* 1172
- 
-

# CONTENTS

---

## Reviews

- Models of Traumatic Brain Injury in Zebrafish (*Danio rerio*)  
*V. Ya. Babchenko, A. S. Belova, A. A. Bashirzade, M. A. Tikhonova, K. A. Demin,  
K. N. Zabegalov, E. V. Petersen, A. V. Kalueff, and T. G. Amstislavskaya* 1059
- Lymphangiogenesis and Features of Lymphatic Drainage in Different Organs.  
Importance for the Allograft Future  
*M. N. Pankova and G. I. Lobov* 1077
- 

## Experimental Articles

- The Ghrelin Receptor Antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 Reduces the Risk Behavior  
in the Rat Gambling Model by Altering the Turnover of Dopamine and Serotonin  
*A. A. Lebedev, I. V. Karpova, E. R. Bychkov, N. D. Yakushina, I. Yu. Thyssen,  
K. E. Gramota, N. S. Efimov, and P. D. Shabanov* 1100
- Age-Related Dynamics of Visual Priming  
*L. V. Cherenkova and L. V. Sokolova* 1112
- Inhibition of GABA-Transaminase and GABA-Transporters in the Brain  
with Vigabatrin and Tiagabin Prevents the Development of Seizures  
in Rats Breathing Hyperbaric Oxygen  
*I. T. Demchenko, S. Yu. Zhilyaev, T. F. Platonova,  
O. S. Alekseeva, and E. R. Nikitina* 1126
- Effect of Nephrectomy on the Reactivity of Arteries  
from the Spontaneously Hypertensive Rats  
*V. N. Yartsev* 1138
- Changes in the Contribution of  $K_{ATP}$ -Channels to the Basal Tone and Dilation  
of the Rat Pial Arterial Vessels after Ischemia  
*O. P. Gorshkova and I. B. Sokolova* 1150
- The Effect of Different Modes of Exercise on the Hemostatic System  
and the Protein Concentration Irisin in the Experiment  
*Y. A. Bondarchuk, I. I. Shakhmatov, I. N. Manaeva, V. M. Raevskikh,  
P. S. Marshalkina, and D. A. Prokopets* 1162
- Features of Motor Control of Healthy Volunteers in a “Hybrid Pose” Due  
to the Lower Limb Exoskeleton  
*N. D. Babanov, O. V. Kubryak, I. V. Merkurjev, and I. A. Orlov* 1172
- 
-

---

---

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

---

---

МОДЕЛИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ  
У ЗЕБРАДАНИО (ZEBRAFISH, *DANIO RERIO*)

© 2021 г. В. Я. Бабченко<sup>1, 2, \*</sup>, А. С. Белова<sup>1, 2</sup>, А. А. Баширзаде<sup>1</sup>,  
М. А. Тихонова<sup>1, 2</sup>, К. А. Демин<sup>3, 4, 5</sup>, К. Н. Забегалов<sup>6</sup>,  
Е. В. Петерсен<sup>7</sup>, А. В. Калуев<sup>1, 2, 6, 8</sup>, Т. Г. Амстиславская<sup>1, 2, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Российский научный центр радиологии и хирургических технологий  
им. акад. А.М. Гранова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup>Национальный медицинский исследовательский центр  
им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup>Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи, Россия

<sup>7</sup>Московский физико-технический институт, Москва, Россия

<sup>8</sup>Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

\*E-mail: v.babchenko@gsu.ru

\*\*E-mail: amstislavskayag@physiol.ru

Поступила в редакцию 16.04.2021 г.

После доработки 02.06.2021 г.

Принята к публикации 21.06.2021 г.

В современной медицине отмечается повышенный интерес к изучению патогенеза черепно-мозговой травмы (ЧМТ). Это продиктовано, прежде всего, высоким уровнем госпитализаций пациентов с данной патологией, большой летальностью, а также несовершенством существующих методов лечения. Для большего понимания патогенеза ЧМТ необходима правильная постановка эксперимента, которая, в свою очередь, начинается с правильного подбора модели на животных. Рыба зебраданио (*Danio rerio*) показала себя как перспективный организм для исследований молекулярных событий, лежащих в основе патогенеза ЧМТ. Среди преимуществ данного модельного организма – высокая степень генетической гомологии с человеком, относительно низкая стоимость, высокий нейрорегенераторный потенциал. Патогенез ЧМТ включает в себя ряд процессов: первичное травматическое повреждение, нейровоспаление, нейродегенерацию, отек мозга, и нейрорегенерацию. На сегодняшний день уже установлены многие важнейшие события вышеперечисленных процессов на грызунах. Однако молекулярные процессы патогенеза ЧМТ во многом остаются загадкой для нашего понимания. В данном обзоре рассмотрены экспериментальные модели ЧМТ на рыбах зебраданио, их преимущества и недостатки по отношению к другим модельным организмам. Также в обзоре представлены сводные данные по патофизиологии, молекулярной биологии каждого из вышеназванных процессов патогенеза ЧМТ. Приведен ряд примеров экспериментальной терапии ЧМТ на зебраданио, отражающих перспективу развития этого направления. Сделан вывод о перспективах использования зебраданио в качестве модельного объекта для исследований патогенеза ЧМТ.

**Ключевые слова:** нейровоспаление, нейродегенерация, нейрорегенерация, отек мозга, черепно-мозговая травма, зебраданио, терапия черепно-мозговой травмы

DOI: 10.31857/S0869813921090028

**Таблица 1.** Экспериментальные модели ЧМТ на животных

Модель	Преимущества	Ссылки
Мыши	Удобный объект для молекулярно-генетических исследований Генетическая гомология с человеком 80% Существование многих линий с различными характеристиками ЦНС	106
Крысы	Большой размер головы является удобным для моделирования падением свободного груза Удобство для когнитивных исследований Прочный череп Плотные структуры черепа	101
Рыбы зебраданио	Низкая стоимость особей по отношению к другим животным Высокий нейрорегенераторный потенциал после ЧМТ, что позволяет исследовать его механизмы Генетическая гомология с человеком 70% Удобство отслеживания и документации течения ЧМТ в режиме реального времени Сходство с млекопитающими в организации генов, участвующих в функционировании иммунной системы и потенциально вовлеченных в нейровоспаление при ЧМТ	10 6 107 7 8

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) представляет собой совокупность патофизиологических и морфологических изменений функции мозга, вызванных внешним воздействием, например – ударом, пенетрацией или сотрясением [1]. ЧМТ является остройшей проблемой мирового здравоохранения, число госпитализаций и посещений отделений неотложной помощи пациентами данного профиля составило 100 и 247 посещений, соответственно, на 100 000 населения [2]. В США ежегодно 1.7 млн человек страдают от ЧМТ, около 80% из них классифицируются как легкая ЧМТ, а смертность достигает 3% [3]. Необходимость курации пациентов с ЧМТ ставит перед исследователями задачу поиска механизмов развития клинической картины ЧМТ, а также ее потенциальной терапии. Для этого важна адекватная постановка эксперимента, которая невозможна без правильного подбора экспериментальной модели. По этическим причинам возможности исследований на человеке сильно ограничены, поэтому большая часть научных работ выполнена на животных, в первую очередь, на грызунах. Таким образом, полученные на модельных организмах данные являются ключом к пониманию патофизиологии ЧМТ и разработке новых подходов к ее лечению [4, 5]. В табл. 1 приведены характеристики различных экспериментальных моделей ЧМТ.

Клиническая картина ЧМТ включает в себя общемозговую симптоматику (головную боль, тошноту, головокружение, нарушения сознания) и фокальную неврологическую симптоматику.

### МОДЕЛИ ЧМТ НА ЗЕБРАДАНИО

Зебраданио является удобным экспериментальным животным в нейробиологии в силу высокой генетической гомологии с геномом человека (порядка 70%) и физиологического сходства основных систем органов и тканей. Большой спектр молекулярно-генетических средств манипуляции создает этому животному конкурентное преимущество по сравнению с другими модельными животными в данной сфере исследований. В частности, появилась возможность отслеживания и документации течения ЧМТ в режиме реального времени благодаря использованию рыб с конкретными и легко идентифицируемыми флуоресцентными репортерными трансгенами. Помимо сходства в организации генов, потенциально вовлечен-

ных в процесс нейровоспаления, зебраданио обладает высоким нейрорегенераторным потенциалом, что закономерно делает ее привлекательным объектом для исследований вопросов нейрорегенерации при различного рода неврологических заболеваниях [6–8], в том числе ЧМТ.

Один из первых, наиболее распространенных и простых методов индукции ЧМТ у зебраданио – игольчатая травма [9, 10]. Согласно данной методике, после анестезии рыбу помещают в разрез пропитанной раствором анестетика трикаина губки. Под диссекционным микроскопом инсулиновым шприцем вертикально (не глубже 2 мм) пронизывают медиальный отдел теленцефалона, а травмированную рыбу помещают в отдельный контейнер для восстановления. Выживаемость при данной модели ЧМТ обычно составляет 97%. С ее помощью были оценены клеточный ответ и молекулярные механизмы, вовлеченные в процесс репарации и регенерации мозга [9].

В другом похожем протоколе канюля диаметром 300 мкм вводится через ноздрю (на глубину 6–8 мм), вдоль рострокаудальной оси тела, проникая через обонятельную луковицу в каудальную часть теленцефалона [11]. Выживаемость в данной модели составляет более 90%, и с ее помощью была произведена оценка реактивной пролиферации и миграции нейроглии в ответ на механическое повреждение ткани мозга [11].

Модель ЧМТ мозжечка у зебраданио сходна с предыдущими, а ориентиром для введения инсулиновой иглы в данном случае служит пигментация кожи. Игла погружается в пластиковую трубку (край которой служит ограничителем глубины погружения). Игла устанавливается в полностью вертикальное положение и вводится на глубину 1.5 мм. При помощи данной методики формирования ЧМТ изучены молекулярные сети белок-белковых сигнальных взаимодействий, вовлеченных в процессы аксонального роста, репарации, ангиогенеза, нейрогенеза и нейровоспаления [12].

Высокоинтенсивный сфокусированный ультразвук для индукции механического повреждения мозга рыбы оказывает термические и механические эффекты на ткани. Апертура ультразвукового трансдюсера составляет 125 мм в диаметре и 100 мм в длину. Встроенный в систему сканер Sonix RP Scanner (BK Ultrasound, Richmond, Канада) позволяет отслеживать в реальном времени критические для ткани параметры воздействия. Для выравнивания головы и трансдюсера используют ультразвуковой визуализационный модуль. Фокальный пик акустического давления при максимальной силе испускания может составлять 20 Мпа. В данной модели вызываются значительные нарушения поведения рыб, в том числе гиполокомия (снижение дистанции плавания и скорости), а также изменения в паттерне экспрессии ряда генов мозга. Так, например, установлено реактивное усиление экспрессии каспазы-3 и  $\beta$ -APP, а также изменение экспрессии генов микротрубочек ( $\beta$ -III tubulin) и нейрофиламентов (NF200), что приводит к нарушению аксонального транспорта и аксональному отеку [13].

Еще один эффективный метод постановки ЧМТ на зебраданио был адаптирован с модели на крысах и основывается на падении свободного груза (в качестве механического воздействия) на голову рыбы [14]. Данная модель позволила реализовать диффузную, не пенетрирующую (т.е., без деструкции кости и точечного, глубокого разрушения ткани мозга) модель ЧМТ. Для этого был сконструирован аппарат, представляющий собой пластиковую трубку (с наружным диаметром 12.7 мм и внутренним 4.7 мм), удерживающуюся с помощью зажима на штативе. На основание штатива ставится аквариум, заполненный водой, на который помещается губка, в которой фиксируется рыба. После анестезии, голова рыбы помещается под трубку и выравнивается, а 4.5-миллиметровый стальной груз весом 0.33 г, выпадая из трубки и развивая скорость 1.5 м/с, достигает черепа рыбы с ударной силой 35 мДж. После данной процедуры рыба сразу выпускается в аквариум под губ-

кой. На данной модели проанализированы молекулярные механизмы, вовлекаемые в ответ на повреждение, и установлено, что на 3-й день после ЧМТ приходится пик воспалительного ответа, а на 21-й день запускается процесс нейрорегенерации [14].

Помимо взрослых рыб, описаны также модели ЧМТ у личинок зебр аданио. Так, вторичное повреждение ткани мозга продемонстрировано на трехдневных личинках зебр аданио, которые выдерживались в растворах с концентрациями глутамата 5, 10 и 20 мкМ, а также в растворах антагониста рецепторов глутамата МК-801 в концентрациях 100, 200 и 400 нМ. Были оценены характеристики выживаемости, поведения и нейроапоптоза в разных группах, и отмечен значительный эффект в отношении выживаемости нейронов и поведения рыб при концентрациях МК-801 равных 200 и 400 нМ [4].

Еще одна химически обусловленная модель ЧМТ на личинках зебр аданио основана на применении аторвастатина (1 мкМ) в опытах на эмбрионах, что приводило к разрушению мозговых сосудов и формированию у личинок внутримозговой гематомы, напоминая клиническую ЧМТ, осложненную внутримозговой геморрагией [15].

Наконец, еще один подход к моделированию осложненной гематомой ЧМТ на личинках зебр аданио основан на генетических манипуляциях гена *arhgef7*, который кодирует белок Rac GEF  $\beta$ rix, вовлеченный в регуляцию ангиогенеза и структурной целостности сосудистой стенки [16]. В этой модели используются линии с мутацией в данном гене, что приводит к разрушению стенок мозговых сосудов и развитию гематомы. На данной модели изучена роль посттравматического кровоизлияния в процессах апоптоза, нейровоспаления, повреждения ткани мозга, а также в изменении локомоторной функции [15].

## ПАТОГЕНЕЗ ЧМТ

Патогенез ЧМТ включает в себя ряд неспецифических компонентов, таких как нейровоспаление, отек, нейродегенерация, нейрорегенерация, которые характерны и для других патологий ЦНС, в частности, ишемического повреждения. Неспецифические компоненты патогенеза ЧМТ определяют отсроченное течение заболевания и составляют вторичное повреждение ткани. Однако существует и ряд специфических компонентов, отличающих патогенез ЧМТ от других патологий любого рода, они будут рассмотрены в конце раздела на примере сравнения с ишемией.

### 1. Нейровоспаление

Нейровоспаление является одним из ведущих компонентов патогенеза ЧМТ. Значительную роль в ЧМТ-индуцированном нейровоспалении играет продукция провоспалительных цитокинов. Например, у крыс показана роль интерлейкина (ИЛ) ИЛ-1 $\beta$  как одного из ключевых участников ЧМТ-индуцированного нейровоспаления, поскольку выброс данного цитокина стимулировал синтез и усиление активности матриксных металлопротеаз 2-го и 9-го типов (ММР-2 и -9) в зоне повреждения [17], и продемонстрирована важная роль ИЛ-1 в усилении проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и нейроапоптоза при ЧМТ [18].

Микроглия, являясь мозговым резидентным макрофагом, обладает способностью к фагоцитозу, продукции цитокинов и презентации антигенов [19]. В контексте воспаления микроглия существует в 2-х формах (фенотипах) – М1 и М2. М1-микроглия продуцирует провоспалительные цитокины, например, фактор некроза опухоли (ФНО- $\alpha$ ), ИЛ-1, ИЛ-6 и индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS), тогда как М2-микроглия выделяет противовоспалительные факторы (ИЛ-6, ИЛ-4 и ИЛ-13, а также трансформирующий фактор роста (ТФР $\beta$ )). Данное явление называется функциональной поляризацией микроглии и является ключевым компонентом нейровоспаления, отека и в некоторой мере нейродегенерации [20]. М1-микро-

глия способна к продукции оксида азота и реактивных форм кислорода (РФК), обладая цитотоксическими свойствами [21]. Функциональная поляризация в сторону M1-подтипа микроглии обеспечивается действием внешних (липосахарид, факторы транскрипции IRF 7, 8) [22, 23] и внутренних сигнальных молекул (LSN2, miRNA-155) [28]. В то же время фактор транскрипции IRF 3 [24], miRNA-124 [25] и Rho-киназа обеспечивают функциональную поляризацию в сторону M2-микроглии [26]. При ЧМТ в окружающую ткань выбрасывается большое количество фрагментов клеточных и внеклеточных структур, что является молекулярным профилем биологической опасности (danger-associated molecular patterns, DAMP). Микроглия обладает определенным набором рецепторов (TLR), распознающих молекулы, к которым относятся липосахарид, осколки РНК, ДНК, шапероны, HMGB1 и CpG-мотивы (обычно ассоциированные с микробным геномом), что активирует микроглию, наработку провоспалительных цитокинов и, в итоге, запускает каскад нейровоспаления [27, 28]. Стимуляция TLR приводит к активации микроглии и высвобождению провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, CXCL1), а блокировка TLR – к снижению или полному прекращению их высвобождения [29]. Активированная микроглия за счет выброса провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$ ) воздействует на астроциты, приводя к их активации, усилению экспрессии TLR и выбросу провоспалительных цитокинов [30]. На данный момент известно, что стимуляция TLR3 ведет к продукции ИЛ-6, 10, 12, CXCL-10, интерферона (ИНФ) $\beta$  и ФНО $\alpha$ , TLR4 – продукции ИЛ-10, CXCL10, а TLR2 – продукции ИЛ-6 и ИЛ-10 [31]. Помимо этого, активированная микроглия высвобождает М-CSF, мозговой нейротрофин BDNF, нейротрофин-3, что способствует трансмиграции лейкоцитов из системного кровотока [32–34].

Астроциты являются участниками нейровоспалительного каскада и содержат RIG-подобные рецепторы (RLR), активация которых ведет к фосфорилированию транскрипционного фактора IRF3 и высвобождению интерферона 1-го типа (ИНФ-1). Помимо этого, усиливается экспрессия маркеров активированных астроцитов GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) и виментина [35]. Активированные астроциты становятся источниками провоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-1, ИЛ-6, MIP-2, MCP-1, ФНО- $\alpha$ , ИНФ $\gamma$ , CCL 2, 3, 5, а также Ig-подобных адгезивных молекул (ICAM-1, VCAM-1) и главного комплекса гистосовместимости МНСII на своей поверхности в ответ на активацию TLR [36–38]. Передача сигнала от рецепторов внутрь астроцитов осуществляется через JAK1–STAT1, MyD88, NF-kB, MAPK-опосредованные сигнальные пути, которые активируются в ответ на стимуляцию TLR4. Активация данных сигнальных путей ведет к усилению транскрипции провоспалительных цитокинов, MMP-9, VCAM-1 [39]. Параллельно, активированные астроциты морфологически изменяются, пролиферируют и заполняют собой зону поражения. Данный процесс называется астроглиозом, а сформированная таким образом структура – глиальным рубцом [40]. Показано, что реактивный глиоз в зоне поражения спинного мозга мыши способствовал репаративным процессам и функциональному восстановлению [41].

Активированный провоспалительными цитокинами (преимущественно ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$ , ИНФ $\gamma$ ) эндотелий усиливает экспрессию Ig-подобных адгезивных белков (VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1) на своей поверхности, что служит возможностью для лейкоцитов проникнуть через ГЭБ в зону деструкции [42–44]. Проникающий клеточный состав представлен лимфоцитами (Т и В), моноцитами и нейтрофилами [44–46]. Самыми ранними клетками являются нейтрофилы, которые появляются в мозговой паренхиме на 3-и–5-е сутки, однако в виде периваскулярного инфильтрата они видны уже через 24 ч [45]. Количество CD14+ клеток (моноцитарные макрофаги) в мозговой паренхиме достигает пика на 4-е–8-е сутки после травмы и удерживается таковым недели [46]. При этом нейтрофилы инфильтриру-

ют в первую очередь ворсинчатые сплетения желудочков. Ворсинчатые сплетения желудочков активно продуцируют большое количество хемокинов после травмы (CINC-1, CXCL1, CINC-2 $\alpha$  или CXCL3, и CINC-3 или CXCL2), которые, в свою очередь, служат хемоаттрактантами для нейтрофилов. Предположительно, из этой зоны нейтрофилы мигрируют к очагу поражения [47]. Связывание ICAM-1 с белком LFA-1 на поверхности лейкоцита приводит к активации протеинкиназы C, которая фосфорилирует белки цитоскелета, обеспечивая их реорганизацию, что необходимо для трансмиграции клетки через ГЭБ [48].

Система комплемента, компоненты которой проникают через поврежденный ГЭБ в зону нейровоспаления, оказывает цитотоксический и деструктивный эффект на клетки и ткань. В цереброспинальной жидкости повышены уровни C3-компонента, комплекса C5b-C9 и фактора B [49, 50]. Молекула CD59 является ключевым регулятором формирования МАК (мембраноатакующего комплекса), защищающим ткань от излишнего повреждения. Выключение молекулы CD59 приведет к ухудшению состояния ткани после ЧМТ [51]. Таким образом, комплемент является важным компонентом нейровоспаления.

Роль ММР в ЦНС сводится к регуляции нейрональной миграции в зону повреждения, деградации ингибирующих аксональный рост протеогликанов и регуляции построения олигодендроглиоцитарных отростков вдоль растущих аксонов в период миелогенеза [52, 53]. В контексте нейровоспалительного процесса установлена роль ММР-2 и -9 как факторов, способствующих повышению проницаемости ГЭБ и трансмиграции лейкоцитов в зону воспаления. Продукция ММР осуществляется сосудистым эндотелием и резидентными глиальными клетками. Механизм действия ММР на ГЭБ основан на снижении экспрессии адгезивных белков между эндотелиоцитами, в частности ZO-1 [55, 56]. Однако на данный момент сведения о роли ММР в нейровоспалении на моделях зебрании отсутствуют.

## *2. Нейрорегенерация*

Зебранию обладают высоким потенциалом к нейрорегенерации (по сравнению с млекопитающими), что делает их подходящими объектами для исследований нейрорегенераторных процессов при ЧМТ и нейродегенеративных заболеваниях. Это обусловлено и большим количеством зон нейрогенеза в мозге зебрании, в том числе обонятельные луковицы, дорзальный теленцефалон (регион, гомологичный гиппокампу млекопитающих), преоптическая область, дорзальная зона перивентрикулярного гипоталамуса, оптический тектум, продольный валик, вагальная долька, паренхима вокруг ромбэнцефалического желудочка и в области продолговатого мозга, расположенной латерально от дорзального моторного ядра блуждающего нерва, а также в мозжечке. Напротив, у млекопитающих существуют лишь две основные зоны нейрогенеза во взрослом состоянии – субвентрикулярная (в боковых желудочках) и субгранулярная (в зубчатой извилине) [56–59]. В отличие от млекопитающих, у которых пролиферативный процесс носит глиальный характер и превалирует в зоне поражения, у зебрании преобладает пролиферация в нейрогенных зонах, откуда нейрональные предшественники впоследствии мигрируют в зону поражения. Глиоз (усиленная пролиферация глии в зоне поражения) у рыб не выражен и не несет патологического характера, в отличие от млекопитающих [58, 60]. Радиальные глиоциты зебрании несут на себе маркерный белок *her4.1*, а нейрональные клетки-предшественники экспрессируют другой набор маркерных белков, по которым их возможно распознать (*asc 11a*, *delta D*, и *T-box brain protein/Tbr1*). У взрослых рыб *her 4.1*-позитивные радиальные глиоциты обладают потенциалом дифференцировки в нейробласты [10, 61, 62].

В целом, воспаление имеет сложные взаимоотношения с нейрорегенерацией. С одной стороны, нейровоспаление препятствует нейрорегенерации, усугубляя повреждение ткани, но с другой, может служить стимулятором для процесса нейрогенеза. Установлены сложные взаимодействия между сигнальными путями нейрогенеза, ангиогенеза, воспаления и аксонального роста. Как указывалось ранее, воспаление служит стимулятором нейрогенеза. Среди этих сигнальных путей наибольшее количество опосредовано PI3K, PAK2 и PLXNA3 [12]. BDNF – давно известный нейротрофин, мишенями которого являются TrkB- и p75NTR-рецепторы, через которые данный фактор реализует свое участие в процессах аксонального роста, нейрогенеза, нейронального выживания, нейрональной миграции, миелинизации, дифференцировки и синаптической пластичности [63]. Отмечается повышенная экспрессия BDNF в регенеративных зонах мозга зебраданио, а его мРНК обнаружена в радиальных глиоцитах и пролиферирующих нейробластах [64].

Анализ экспрессии большого количества мозговых генов выявил изменения экспрессии на разные сроки (на 3-и и 21-е дни) после ЧМТ, в том числе генов сигнальных путей MAPK, Notch, цАМФ и других. Практически все эти гены относятся к регуляторам выживаемости нейронов, аксонального роста, апоптоза и репарации ткани. Третий день после повреждения является пиковым для экспрессии генов, связанных со стресс-реакцией на повреждение (MAPK, p53, Notch1), а на 21-й день отмечается преобладание экспрессии генов, связанных с нейрорегенеративными процессами, к которым относятся гены компонентов промежуточных филаментов, Notch1 и Junb [14]. Наконец, MMP-2 и -9 также важны для развития нейровоспаления (см. выше) и у взрослых зебраданио усиливают аксональный рост [65].

### *3. Нейродегенерация*

В клинике показано наличие корреляционной связи между ЧМТ и развитием болезни Альцгеймера (БА) [66–68]. На моделях у крыс показано, что ЧМТ провоцирует снижение количества нейронов в гиппокампе, что может объяснить ретроградную амнезию после ЧМТ [69]. Нейроапоптоз складывается из ряда событий, в том числе протеолиза белков цитоскелета [70] и оксидативного стресса, который возникает в течение первого часа после ЧМТ как следствие митохондриальной дисфункции и нарушения внутриклеточного кальциевого баланса. Свободные радикалы повреждают генетический материал, белковые молекулы, липидные молекулы мембран [71–74]. Основой митохондриальной дисфункции служат нарушения транспорта электронов электронотранспортной цепи, снижение утилизации глюкозы и снижение экспрессии белков комплекса цитохром С-оксидазы I, II, III [75]. Другим событием становится отложение белков ( $\beta$ -амилоида, нейрофиламентных белков и  $\alpha$ -синуклеина) вдоль всего белого вещества и в других компартментах пораженного мозга, что еще раз подтверждает роль ЧМТ как фактора риска в развитии БА и паркинсонизма [76].

Хроническая травматическая энцефалопатия, сопровождаемая таупатией, атрофическими изменениями в лобной и височной долях и аксонопатией, была зарегистрирована у солдат и спортсменов, чей спорт был связан с травматизацией головы [77]. Таупатии и аккумуляция белка TDP-43, наряду с аккумуляцией  $\beta$ -амилоида, являются важнейшими событиями в патогенезе нейродегенеративных расстройств БА. Зебраданио, экспрессирующие мутантную форму tau-белка, демонстрируют все патологические особенности таупатии на поведенческом, тканевом и клеточном уровнях [78]. Используя ультразвуковую установку (см. выше) для вызова ЧМТ у зебраданио, показано, что в мозге рыб повышаются содержание каспазы-3, NF160 (нейрофиламента, обеспечивающего структурную поддержку аксонов),

микротрубочкового  $\beta$ -III тубулина (цитоскелетного белка, задействованного в аксональном росте и транспорте) в зоне аксонального отека и деструкции, а также накопление  $\beta$ -амилоида [13].

Накопление внеклеточного глутамата при ЧМТ возникает как следствие снижения экспрессии его транспортеров (GLT-1, GLAST) в астроцитах, нарушения их работы (на фоне снижения градиента ионов  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), а также усиленного высвобождения глутамата из аксональных терминалей во внеклеточное пространство. Гиперстимуляция ионотропных NMDA-рецепторов глутамата приводила к усиленному (или даже бесконтрольному) поступлению ионов  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь клетки и эксайтотоксичности. Также нейротоксичность может осуществляться и через метаботропные рецепторы глутамата (mGluR 1-8), в итоге формируя отек, ацидоз клетки, оксидативный стресс и вазоспазм. Данный каскад имеет положительную обратную связь, а следовательно, склонен к формированию порочного круга и вовлечению все большего объема поражения ткани [79, 80]. На личинках зебрании показано, что МК-801 и ингибитор кальпаина MDL-28170 улучшают локомоторную функцию рыб, свидетельствуя об эксайтотоксичности как о значимом событии в патогенезе вторичного повреждения ткани мозга при ЧМТ [81].

#### 4. Отек мозга

Главные концептуальные представления о роли отека мозга при ЧМТ начали развиваться еще в середине 20 века, когда отек мозга был поделен на цитотоксический и вазогенный подтипы [82]. В клинической картине ЧМТ за зоной травматического поражения сразу следует зона перифокального отека мозга, которая может расширяться на все полушарие и компримировать весь мозг, что может стать причиной комы. Развивается отек мозга в первые 24 ч после ЧМТ. В зоне травматического поражения наблюдается раневая канал или очаг контузии (некроз и деструкция ткани) с геморрагической трансформацией в этой зоне. Далее следуют организация содержимого зоны поражения и образование глиального рубца. Через 48 ч в зоне отека появляются макрофаги. В белом веществе появляются участки отека в виде вакуолей, а в области нейропилия наблюдаются реактивные астроциты. Долгосрочный отек (несколько месяцев) ведет к периваскулярному появлению крупных, разбухших реактивных астроцитов – гемистоцитов. Нейронофагия развивается на 12-й–24-й час после ЧМТ, на 24-й–48-й час развивается отек и разбухание аксонов вокруг поражения и даже на отдалении (аналогично диффузному аксональному повреждению). На 5-й–6-й месяцы развивается отек (разбухание) и дегенерация нейронов [83].

Отек мозга способствует демиелинизации, тем самым усугубляя нейродегенерацию [84]. Повреждение ГЭБ является основной причиной накопления жидкости в межклеточной ткани и как следствие – увеличения объема мозга [85].

В 2000-х годах в структуру концепций патогенеза отека входят представления о количественных и функциональных изменениях со стороны ионных каналах и белков плотных межклеточных соединений ГЭБ. Так, повышенная экспрессия белка аквапорина 4 (AQP4) в астроцитах перишемизированной зоны, эндимотицах является патогенетическим фактором вазогенного отека [86]. Вода, свободные ионы и белки плазмы под действием гидравлического давления внутри капилляров, а также осмотического и онкотического градиентов давлений подвергаются трансудации из просвета сосуда в межклеточное пространство [86–88].

Отмечается также значимость SUR1-рецепторов в патогенезе цитотоксического отека при ЧМТ, так как активации этих каналов способствует истощение запасов АТФ внутри клетки, а результатом их активации становится неконтролируемое поступление ионов и воды внутрь клетки. Экспрессируются SUR1-рецепторы в аст-

роцитах, нейронах и капиллярах [89]. Эндотелиальный  $\text{Ca}^+$ -канал TRPV4 также задействован в каскаде отека и экссудации плазмы в интерстиций. Его активация приводит к снижению экспрессии молекул межклеточных соединений (claudin-1, -3, -4, -5, -7 и -8) на эндотелиальных клетках, что служит еще одним фактором развития вазогенного отека [90]. Установлена повышенная экспрессия AQP4 в астроцитах как причина цитотоксического отека: через водный канал, который образует данный белок в мембране, внутрь астроцитов устремляются компоненты плазмы (вода, ионы и белки) [91]. На примере модели гипергликемии крыс установлено, что усиление деградации белка окклюдина ведет к нарастанию отека [92]. Определена значимость провоспалительных цитокинов в зоне повреждения (ИЛ-1, -6, ФНО- $\alpha$ ) для усиления экспрессии белка AQP4. Как указано выше, усиленная экспрессия AQP4 является молекулярным маркером отека, подчеркивая взаимосвязь нейровоспаления и отека мозга [93]. На модели ЧМТ у крыс также проведена оценка проницаемости ГЭБ, его структурной целостности и экспрессии белков межклеточных соединений (окклюдин, клаудин-5, ZO-1). Экспрессия белков межклеточных соединений после ЧМТ была заметно ниже, чем в контрольной группе, а проницаемость ГЭБ и отек мозга – выше [94].

Несомненно, патогенезы ЧМТ и церебральной ишемии во много сходны. Но в отличие от ишемического повреждения при ЧМТ происходит одномоментное воздействие механического фактора или силы ускорения. В результате возникает одномоментное механическое разрушение ткани или первичное травматическое повреждение. В зоне поражения разрушаются мембраны клеток и стенки сосудов, а также возникают разрывы аксонов. Последнее особенно характерно для воздействия силы ускорения. Весь этот комплекс изменений при травматическом поражении наблюдается за мгновение. При ишемизации нарастает дефицит энергетического субстрата, местный метаболический ацидоз и ионные нарушения. Некроз в зоне развивается лишь несколько минут спустя. Однако установлено, что через некоторое время в перитравматической зоне (пенумбре) развивается ишемия, это позволяет нам говорить о последней как об одном из механизмов вторичного повреждения ткани [95].

## ТЕРАПИЯ ЧМТ У ЗЕБРАДАНИО

Возможность реконструкции структуры поврежденной ткани изучена на модели иглового ЧМТ у зебранию, в которой рыбам в место повреждения в виде гидрогелевой смеси вводился нанопептидный каркас для облегчения ангиогенеза и нейрогенеза. Нанопептид RADA16-SVVYGLR претерпевал самосборку, образуя сети нанопептида, которые контролировали физико-химические факторы микросреды в зоне поражения (рН, ионный состав), и такой каркас поддерживал эндотелиоциты, образуя трубчатую структуру и облегчая ангиогенез и миграцию нейронных стволовых клеток [96]. Другая подобная методика основывалась на трехмерной печати, при которой нейронные клетки-предшественники погружаются в гидрогель, который распечатывается и встраивается в головной мозг рыб, способствуя нейрональному росту и регенерации ЦНС после ЧМТ [97].

Используемое в лечении БА и паркинсонизма вещество Cytidine 5'-Diphosphocholine (CDP-choline) продемонстрировало широкий спектр терапевтической активности на модели ЧМТ, индуцируемой у личинок зебранию методом введения иглы в дорзальную часть правой стороны заднего мозга. Данный препарат индуцировал умеренную экспрессию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в зоне поражения, что стимулировало миграцию микроглиальных клеток в эту зону и аккумуляцию в ней. Активированные микроглиальные клетки осуществляли клиренс в зоне поражения, а противовоспалительные цитокины спо-

способствовали снижению воспаления и процессам нейрорегенерации в пораженной области, также подавляя нейроапоптоз [96].

Наконец, определенные надежды возлагаются на стволовые клеточные технологии в сфере регенеративной медицины. Одним из возможных направлений работы в этой среде – это периваскулярные клетки пупочного тяжа. На модели ЧМТ, индуцированной ультразвуком у зебрადанио, показано, что подсадка данных клеток улучшает показатели локомоторной активности и снижает тревожное поведение, астроглиоз и апоптоз [97].

### СОПОСТАВЛЕНИЕ ЗЕБРАДАНИО И ГРЫЗУНОВ КАК МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ

На сегодняшний день модель латерального гидродинамического удара (LFP) на грызунах является классической. Данный метод позволяет смоделировать структурно-функциональные, поведенческие и неврологические изменения, аналогичные наблюдаемым в клинической практике. Данный метод позволяет выбирать угол, силу и точку приложения воздействия [98, 99]. В работе Shalini Das Gupta и соавт. продемонстрирована возможность использования микроРНК (miR-9-3p, miR-136-3p) как маркеров ЧМТ, при этом концентрация данных маркеров в плазме повышалась как среди пациентов, так и среди группы травмированных животных [100]. С помощью этого метода экспериментально была вызвана эпилептиформная ЭЭГ-активность у животных, которая соответствовала таковой у пациентов после ЧМТ по данным метода электрокортикографии [101]. Это доказывает валидность модели LFP для прямой двунаправленной трансляции в клинику.

Модель индуцируемой ультразвуком ЧМТ у зебрადанио также позволяет менять угол, точку приложения и силу воздействия [13]. На модели ультразвук-индуцируемой ЧМТ у зебрადанио была успешно вызвана эпилептиформная ЭЭГ-активность, записанная с поверхности мозга рыбы [102]. Специфические поведенческие тесты позволяют оценить функциональные изменения в работе головного мозга животного путем скрининга таких параметров как двигательная активность, пространственная память, тревожность [14]. Таким образом, зебрადанио также может претендовать на звание валидной модели ЧМТ для прямой двунаправленной трансляции в клинику.

Отличительной особенностью, ограничивающей прямые трансляционные возможности зебрადанио, является менее четкая дифференцировка мозга на отделы по сравнению с млекопитающими. Однако все же существует достаточная для молекулярно-клеточных исследований гомология между имеющимися структурами головного мозга зебрადанио и млекопитающих. Так, субпалеум является гомологом стриарных образований у млекопитающих, а дорзальный палеум – гиппокампа [103]. Помимо того, в силу высокой регенераторной способности не возникает четкой картины отдаленных последствий вторичного травматического повреждения мозга, таких как глиальный рубец, гибель нейронов. При этом именно вторичное травматическое повреждение составляет основу стойкого неврологического дефицита у пациентов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные тренды в трансляционной биомедицине ставят в приоритет задачу корректного подбора модельного организма. При этом необходимо принимать во внимание расход финансовых средств на приобретение и содержание животного, его анатомо-физиологические особенности, корректность трансляции полученных результатов с модельного животного на человека, молекулярно-генетические особенности вида, а также биоэтические аспекты работы *in vivo*. Как модельный

**Таблица 2.** Отдельные открытые вопросы моделирования ЧМТ у рыб

Как решить проблему недостаточной корреляция между зоной поражения и видимой клинической картиной?
Каким методом лучше всего моделировать ЧМТ у рыб?
Как провести связь между поведенческими тестами и клинической картиной ЧМТ?
В какой области мозга лучше создавать область поражения?
Влияет ли на развитие ЧМТ вид анестезии?
Каково оптимальное время экспозиции в растворе анестетика?
Каковы причины индивидуальных различий у рыб при вызове ЧМТ? Какова летальность разных моделей ЧМТ и ее причины?
Какова временная динамика течения процессов нейровоспаления, нейродегенерации, отека и нейрорегенерации?
Каковы геномные ответы при ЧМТ? Играют ли роль эпигенетические факторы в патогенезе ЧМТ?
Каковы оптимальные подходы к терапии при разных моделях ЧМТ у зебрaдaниo?
Какова роль процессов нейровоспаления, отека, нейродегенерации, нейрорегенерации в изменениях поведения и когнитивных функций у рыб?
Какова роль активации M1- и M2-микроглии в нейровоспалении на моделях зебрaдaниo? Какова роль A1- и A2-подтипов астроцитов в данных процессах?
Насколько корректна трансляция результатов исследований нейровоспаления, нейродегенерации, отека с моделей ЧМТ зебрaдaниo на человека?
Как повлияет повышенный потенциал к нейрорегенерации у зебрaдaниo на корректность трансляции результатов исследований данного процесса на человека?
Каковы особенности цитокинового спектра нейровоспаления у рыб?
Какой метод индукции ЧМТ на модели зебрaдaниo наиболее оптимален для изучения процессов нейровоспаления, отека, нейродегенерации, нейрорегенерации?
Существуют ли линейные, половые и возрастные особенности развития ЧМТ у зебрaдaниo?
Как стресс влияет на динамику патогенеза (и восстановления) при ЧМТ у зебрaдaниo?
Какие физиологические (эндокринные) и биохимические биомаркеры ЧМТ у зебрaдaниo?

организм зебрaдaниo обладает рядом неоспоримых преимуществ. Большое количество разработанных поведенческих тестов и методик работы с геномом, хорошая возможность трансляции результатов молекулярно-генетических и даже поведенческих исследований на человека, высокая регенераторная способность, биоэтическая дозволeнность в сочетании с относительно небольшими затратами на содержание делают данный модельный организм крайне актуальным для большинства перспективных направлений в современных исследованиях. Как было показано выше, моделирование ЧМТ не стало исключением из этого тренда. Зебрaдaниo является оптимальным организмом для исследований тонких молекулярно-генетических и клеточных механизмов патогенеза ЧМТ, в частности, механизмов нейрорегенерации, поиска молекулярных мишеней для терапии. Главная цель, которая может быть достигнута с помощью зебрaдaниo – это разработка терапевтических подходов, направленных на усиление восстановительных возможностей мозга у пациентов.

Существует много открытых вопросов (табл. 2), которые только предстоит решить с использованием моделей ЧМТ на зебрaдaниo. Например, важным новым направлением в моделировании ЧМТ у зебрaдaниo может стать выявление корре-

ляционной связи между локализацией травмы и паттернами молекулярных и поведенческих изменений, что позволит установить взаимосвязь клинической картины с конкретными молекулярными факторами, которые, в свою очередь, могут стать мишенью для патогенетической терапии.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 20-65-46006).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Написание текста рукописи – В. Я. Б., обзор публикаций по теме статьи – В. Я. Б., А. С. Б., А. А. Б., М. А. Т., К. А. Д., К. Н. З., Е. В. П. Рецензирование и редактирование – А. В. К. и Т. Г. А.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Injury Prevention and Control. Report to Congress on mild traumatic brain injury in the United States: steps to prevent a serious public health problem. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (2003). <http://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/pdf/mtbireport-a.pdf>. Accessed April 14, 2021
2. Reid LD, Fingar KR (2020) Inpatient Stays and Emergency Department Visits Involving Traumatic Brain Injury, 2017: Statistical Brief #255. In: Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Res and Quality (US); 2006 Feb – PMID: 32379407.
3. Georges A, McDas J (2021) Traumatic Brain Injury. In: Stat Pearls [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2021 Jan PMID: 29083790.
4. McCutcheon V, Park E, Liu E, Wang Y, Wen XY, Baker AJ (2016) A Model of Excitotoxic Brain Injury in Larval Zebrafish: Potential Application for High-Throughput Drug Evaluation to Treat Traumatic Brain Injury. *Zebrafish* 13(3): 161–169. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1188>
5. O'Connor WT, Smyth A, Gilchrist MD (2011) Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacol Ther* 130(2): 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.001>
6. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthravadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Ürün Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJ, Crollius HR, Rogers J, Stemple DL (2014) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496(7446): 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
7. Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 35(2): 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>

8. *de Abreu MS, Giacomini ACVV, Zanandrea R, Dos Santos BE, Genario R, de Oliveira GG, Friend AJ, Amstislavskaya TG, Kalueff AV* (2018) Psychoneuroimmunology and immunopsychiatry of zebrafish. *Psychoneuroendocrinology* 92: 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.03.2014>
9. *Schmidt R, Beil T, Strähle U, Rastegar S* (2014) Stab wound injury of the zebrafish adult telencephalon: a method to investigate vertebrate brain neurogenesis and regeneration. *J Vis Exp* (90): e51753.  
<https://doi.org/10.3791/51753>
10. *Kishimoto N, Shimizu K, Sawamoto K* (2012) Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. *Dis Model Mech* 5(2): 200–209.  
<https://doi.org/10.1242/dmm.007336>
11. *Kroehne V, Freudenreich D, Hans S, Kaslin J, Brand M* (2011) Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development* 138(22): 4831–4841.  
<https://doi.org/10.1242/dev.072587>
12. *Wu CC, Tsai TH, Chang C, Lee TT, Lin C, Cheng IH, Sun MC, Chuang YJ, Chen BS* (2014) On the crucial cerebellar wound healing-related pathways and their cross-talks after traumatic brain injury in *Danio rerio*. *PLoS One* 9(6): e97902.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097902>
13. *McCutcheon V, Park E, Liu E, Sobhebidari P, Tavakkoli J, Wen XY, Baker AJ* (2017) A Novel Model of Traumatic Brain Injury in Adult Zebrafish Demonstrates Response to Injury and Treatment Comparable with Mammalian Models. *J Neurotrauma* 34(7): 1382–1393.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2016.4497>
14. *Maheras AL, Dix B, Carmo OMS, Young AE, Gill VN, Sun JL, Booker AR, Thomason HA, Ibrahim AE, Stanislaw L, Dallego JC, Ngo CN, Chen A, Fortini BK, Spence RD* (2018) Genetic Pathways of Neuroregeneration in a Novel Mild Traumatic Brain Injury Model in Adult Zebrafish. *eNeuro* 5(1): ENEURO.0208-17.2017.  
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0208-17.2017>
15. *Crilly S, Njagic A, Laurie SE, Fotiou E, Hudson G, Barrington J, Webb K, Young HL, Badrock AP, Hurlstone A, Rivers-Auty J, Parry-Jones AR, Allan SM, Kasher PR* (2018) Using zebrafish larval models to study brain injury, locomotor and neuroinflammatory outcomes following intracerebral haemorrhage. *F1000Res* 7: 1617.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.16473.2>
16. *Liu J, Fraser SD, Faloon PW, Rollins EL, Vom Berg J, Starovic-Subota O, Laliberte AL, Chen JN, Serluca FC, Childs SJ* (2007) A betaPix Pak2a signaling pathway regulates cerebral vascular stability in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (35): 13990–13995.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0700825104>
17. *Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG, Yong VW* (2000) Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* 61(2): 212–224.  
[https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000715\)61:2<212::AID-JNR12>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000715)61:2<212::AID-JNR12>3.0.CO;2-9)
18. *Lu KT, Wang YW, Yang JT, Yang YL, Chen HI* (2005) Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *J Neurotrauma* 22(8): 885–895.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.885>
19. *Hanisch UK, Kettenmann H* (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10(11): 1387–1394.  
<https://doi.org/10.1038/nn1997>
20. *Jha MK, Lee WH, Suk K* (2016) Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochem Pharmacol* 103: 1–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.11.003>
21. *MacMicking J, Xie QW, Nathan C* (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323–350.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>
22. *Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, Inoue K* (2012) IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. *Cell Rep* 1(4): 334–340.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.02.014>
23. *Tanaka T, Murakami K, Bando Y, Yoshida S* (2015) Interferon regulatory factor 7 participates in the M1-like microglial polarization switch. *Glia* 63(4): 595–610.  
<https://doi.org/10.1002/glia.22770>
24. *Cai X, Yin Y, Li N, Zhu D, Zhang J, Zhang CY, Zen K* (2012) Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155. *J Mol Cell Biol* 4(5): 341–343.  
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs044>
25. *Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL* (2011) MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- $\alpha$ -PU.1 pathway. *Nat Med* 17(1): 64–70.  
<https://doi.org/10.1038/nm.2266>
26. *Zhao YF, Zhang X, Ding ZB, Yang XW, Zhang H, Yu JZ, Li YH, Liu CY, Zhang Q, Zhang HZ, Ma CG, Xiao BG* (2015) The therapeutic potential of Rho kinase inhibitor fasudil derivative

- FaD-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Mol Neurosci* 55(3): 725–732.  
<https://doi.org/10.1007/s12031-014-0411-7>
27. *Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM* (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(11): 1013–1021.  
<https://doi.org/10.1093/jnen/61.11.1013>
  28. *Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP* (2009) Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke. *Neuroscience* 158(3): 1007–1020.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.067>
  29. *Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, Wenning GK, Stefanova N* (2013) Toll-like receptor 4 is required for  $\alpha$ -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia* 61(3): 349–360.  
<https://doi.org/10.1002/glia.22437>
  30. *Holm TH, Draeby D, Owens T* (2012) Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia* 60(4): 630–638.  
<https://doi.org/10.1002/glia.22296>
  31. *Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP* (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175(7): 4320–4330.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4320>
  32. *Hicks RR, Numan S, Dhillon HS, Prasad MR, Seroogy KB* (1997) Alterations in BDNF and NT-3 mRNAs in rat hippocampus after experimental brain trauma. *Brain Res Mol Brain Res* 48(2): 401–406.  
[https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(97\)00000-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(97)00000-0)
  33. *Mitrasinovic OM, Perez GV, Zhao F, Lee YL, Poon C, Murphy GM Jr* (2001) Overexpression of macrophage colony-stimulating factor receptor on microglial cells induces an inflammatory response. *J Biol Chem* 276(32): 30142–30149.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M104265200>
  34. *Bianco F, Ceruti S, Colombo A, Fumagalli M, Ferrari D, Pizzirani C, Matteoli M, Di Virgilio F, Abbracchio MP, Verderio C* (2006) A role for P2X7 in microglial proliferation. *J Neurochem* 99(3): 745–748.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04101.x>
  35. *de Rivero Vaccari JP, Minkiewicz J, Wang X, De Rivero Vaccari JC, German R, Marcellio AE, Dietrich WD, Keane RW* (2012) Astrogliosis involves activation of retinoic acid-inducible gene-like signaling in the innate immune response after spinal cord injury. *Glia* 60(3): 414–421.  
<https://doi.org/10.1002/glia.22275>
  36. *Esen N, Tanga FY, DeLeo JA, Kielian T* (2004) Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. *J Neurochem* 88(3): 746–758.  
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02202.x>
  37. *Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I* (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43(3): 281–291.  
<https://doi.org/10.1002/glia.10256>
  38. *Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ, Miller SD* (2005) Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* 49(3): 360–374.  
<https://doi.org/10.1002/glia.20117>
  39. *Gorina R, Font-Nieves M, Márquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM* (2011) Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NF $\kappa$ B signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia* 59(2): 242–255.  
<https://doi.org/10.1002/glia.21094>
  40. *Eng LF, Ghirnikar RS* (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4(3): 229–237.  
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1994.tb00838.x>
  41. *Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV* (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24(9): 2143–2155.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004>
  42. *Chen H, Liu C, Sun S, Mei Y, Tong E* (2001) Cytokine-induced cell surface expression of adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *J Tongji Med Univ* 21(1): 68–71.  
<https://doi.org/10.1007/BF02888042>
  43. *Fabry Z, Waldschmidt MM, Hendrickson D, Keiner J, Love-Homan L, Takei F, Hart MN* (1992) Adhesion molecules on murine brain microvascular endothelial cells: expression and regulation of ICAM-1 and Lgp 55. *J Neuroimmunol* 36(1): 1–11.  
[https://doi.org/10.1016/0165-5728\(92\)90026-h](https://doi.org/10.1016/0165-5728(92)90026-h)
  44. *Carlos TM, Clark RS, Francicola-Higgins D, Schiding JK, Kochanek PM* (1997) Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. *J Leukoc Biol* 61(3): 279–285.  
<https://doi.org/10.1002/jlb.61.3.279>

45. *Holmin S, Söderlund J, Biberfeld P, Mathiesen T* (1998) Intracerebral inflammation after human brain contusion. *Neurosurgery* 42(2): 291–298.  
<https://doi.org/10.1097/00006123-199802000-00047>
46. *Beschorner R, Nguyen TD, Gözalan F, Pedal I, Mattern R, Schluesener HJ, Meyermann R, Schwab JM* (2002) CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury. *Acta Neuropathol* 103(6): 541–549.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-001-0503-7>
47. *Szmydynger-Chodobska J, Strazielle N, Zink BJ, Ghersi-Egea JF, Chodobski A* (2019) The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 29(9): 1503–1516.  
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.71>
48. *Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO* (2000) ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol* 165(6): 3375–3383.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.6.3375>
49. *Kossmann T, Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Jones JL, Barnum SR* (1997) Elevated levels of the complement components C3 and factor B in ventricular cerebrospinal fluid of patients with traumatic brain injury. *J Neuroimmunol* 73(1–2): 63–69.  
[https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(96\)00164-6](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(96)00164-6)
50. *Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Perez D, Redaelli C, Gloor B, Trentz O, Kossmann T* (2001) Intrathecal levels of complement-derived soluble membrane attack complex (sC5b-9) correlate with blood-brain barrier dysfunction in patients with traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 18(8): 773–781.  
<https://doi.org/10.1089/089771501316919139>
51. *Stahel PF, Flierl MA, Morgan BP, Persigehl I, Stoll C, Conrad C, Touban BM, Smith WR, Beauchamp K, Schmidt OI, Eriel W, Leinase I* (2009) Absence of the complement regulatory molecule CD59a leads to exacerbated neuropathology after traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation* 6:2.  
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-2>
52. *Zuo J, Ferguson TA, Hernandez YJ, Stetler-Stevenson WG, Muir D* (1998) Neuronal matrix metalloproteinase-2 degrades and inactivates a neurite-inhibiting chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* 18(14): 5203–5211.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-14-05203.1998>
53. *Uhm JH, Dooley NP, Oh LY, Yong VW* (1998) Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix. *Glia* 22(1): 53–63.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199801\)22:1<53::aid-glia5>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199801)22:1<53::aid-glia5>3.0.co;2-9)
54. *Harkness KA, Adamson P, Sussman JD, Davies-Jones GA, Greenwood J, Woodroffe MN* (2000) Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain* 123 (Pt 4): 698–709.  
<https://doi.org/10.1093/brain/123.4.698>
55. *Song J, Wu C, Korpos E, Zhang X, Agrawal SM, Wang Y, Faber C, Schäfers M, Körner H, Opdenakker G, Hallmann R, Sorokin L* (2015) Focal MMP-2 and MMP-9 activity at the blood-brain barrier promotes chemokine-induced leukocyte migration. *Cell Rep* 10(7): 1040–1054.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.037>
56. *Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A* (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478(4): 359–378.  
<https://doi.org/10.1002/cne.20288>
57. *Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A* (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97(6): 703–716.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80783-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80783-7)
58. *Kizil C, Kaslin J, Kroehne V, Brand M* (2012) Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Dev Neurobiol* 72(3): 429–461.  
<https://doi.org/10.1002/dneu.20918>
59. *Tallafuss A, Kelly M, Gay L, Gibson D, Batzel P, Karfilis KV, Eisen J, Stankunas K, Postlethwait JH, Washbourne P* (2015) Transcriptomes of post-mitotic neurons identify the usage of alternative pathways during adult and embryonic neuronal differentiation. *BMC Genomics* 16: 1100.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-2215-8>
60. *März M, Schmidt R, Rastegar S, Strähle U* (2011) Regenerative response following stab injury in the adult zebrafish telencephalon. *Dev Dyn* 240(9): 2221–2231.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.22710>
61. *Kroehne V, Freudenreich D, Hans S, Kaslin J, Brand M* (2011) Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development* 138(22): 4831–4841.  
<https://doi.org/10.1242/dev.072587>
62. *Kyritsis N, Kizil C, Zocher S, Kroehne V, Kaslin J, Freudenreich D, Iltzsch A, Brand M* (2012) Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science* 338(6112): 1353–1356.  
<https://doi.org/10.1126/science.1228773>

63. Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677–736.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
64. Cacialli P, Gueguen MM, Coumilleau P, D'Angelo L, Kah O, Lucini C, Pellegrini E (2016) BDNF Expression in Larval and Adult Zebrafish Brain: Distribution and Cell Identification. *PLoS One* 11(6): e0158057.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158057>
65. Lemmens K, Bollaerts I, Bhumika S, de Groef L, Van Houcke J, Darras VM, Van Hove I, Moons L (2016) Matrix metalloproteinases as promising regulators of axonal regrowth in the injured adult zebrafish retinectal system. *J Comp Neurol* 524(7): 1472–1493.  
<https://doi.org/10.1002/cne.23920>
66. Mortimer JA, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Rocca WA et al (1991) Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol* 20 Suppl 2: S28–S35.  
[https://doi.org/10.1093/ije/20.supplement\\_2.s28](https://doi.org/10.1093/ije/20.supplement_2.s28)
67. Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S, Rabe-Hesketh S, Giora A (2003) Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(7): 857–862.  
<https://doi.org/10.1136/jnnp.74.7.857>
68. Mehta KM, Ott A, Kalmijn S, Slooter AJ, van Duijn CM, Hofman A, Breteler MM (1999) Head trauma and risk of dementia and Alzheimer's disease: The Rotterdam Study. *Neurology* 53(9): 1959–1962.  
<https://doi.org/10.1212/wnl.53.9.1959>
69. Hicks RR, Smith DH, Lowenstein DH, Saint Marie R, McIntosh TK (1993) Mild experimental brain injury in the rat induces cognitive deficits associated with regional neuronal loss in the hippocampus. *J Neurotrauma* 10(4): 405–414.  
<https://doi.org/10.1089/neu.1993.10.405>
70. Kupina NC, Detloff MR, Bobrowski WF, Snyder BJ, Hall ED (2003) Cytoskeletal protein degradation and neurodegeneration evolves differently in males and females following experimental head injury. *Exp Neurol* 180(1): 55–73.  
[https://doi.org/10.1016/s0014-4886\(02\)00048-1](https://doi.org/10.1016/s0014-4886(02)00048-1)
71. Awasthi D, Church DF, Torbati D, Carey ME, Pryor WA (1997) Oxidative stress following traumatic brain injury in rats. *Surg Neurol* 47(6): 575–581.  
[https://doi.org/10.1016/s0090-3019\(96\)00461-2](https://doi.org/10.1016/s0090-3019(96)00461-2)
72. Xiong Y, Peterson PL, Muizelaar JP, Lee CP (1997) Amelioration of mitochondrial function by a novel antioxidant U-101033E following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 14(12): 907–917.  
<https://doi.org/10.1089/neu.1997.14.907>
73. Mendez DR, Cherian L, Moore N, Arora T, Liu PK, Robertson CS (2004) Oxidative DNA lesions in a rodent model of traumatic brain injury. *J Trauma* 56(6): 1235–1240.  
<https://doi.org/10.1097/01.ta.0000130759.62286.0e>
74. Singh IN, Sullivan PG, Deng Y, Mbye LH, Hall ED (2006) Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: implications for neuroprotective therapy. *J Cereb Blood Flow Metab* 26(11): 1407–1418.  
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600297>
75. Dai W, Cheng HL, Huang RQ, Zhuang Z, Shi JX (2009) Quantitative detection of the expression of mitochondrial cytochrome c oxidase subunits mRNA in the cerebral cortex after experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 1251: 287–295.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.034>
76. Smith DH, Uryu K, Saatman KE, Trojanowski JQ, McIntosh TK (2003) Protein accumulation in traumatic brain injury. *Neuromolecular Med* 4(1-2): 59–72.  
<https://doi.org/10.1385/NMM:4:1-2:59>
77. McKee AC, Daneshvar DH, Alvarez VE, Stein TD (2014) The neuropathology of sport. *Acta Neuropathol* 127(1): 29–51.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-013-1230-6>
78. Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow EM, Berg S, Hellberg S, Fälting J, Distel M, Köster RW, Schmid B, Haass C (2009) A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J Clin Invest* 119(5): 1382–1395.  
<https://doi.org/10.1172/JCI37537>
79. Stokum JA, Kurland DB, Gerzanich V, Simard JM (2015) Mechanisms of astrocyte-mediated cerebral edema. *Neurochem Res* 40(2): 317–328.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-014-1374-3>
80. Yi JH, Hazell AS (2006) Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int* 48(5): 394–403.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.12.001>
81. McCutcheon V, Park E, Liu E, Wang Y, Wen XY, Baker AJ (2016) A Model of Excitotoxic Brain Injury in Larval Zebrafish: Potential Application for High-Throughput Drug Evaluation to

- Treat Traumatic Brain Injury. *Zebrafish* 13(3): 161–169.  
<https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1188>
82. *Klatzo I* (1967) Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 26(1): 1–14.  
<https://doi.org/10.1097/00005072-196701000-00001>
  83. *Cervós-Navarro J, Lafuente JV* (1991) Traumatic brain injuries: structural changes. *J Neurol Sci* 103 Suppl: S3–S14.  
[https://doi.org/10.1016/0022-510x\(91\)90002-o](https://doi.org/10.1016/0022-510x(91)90002-o)
  84. *Nevin NC* (1967) Neuropathological changes in the white matter following head injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 26(1): 77–84.  
<https://doi.org/10.1097/00005072-196701000-00006>
  85. *Povlishock JT, Becker DP, Sullivan HG, Miller JD* (1978) Vascular permeability alterations to horseradish peroxidase in experimental brain injury. *Brain Res* 153(2): 223–239.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90404-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90404-3)
  86. *Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, Maruno M, Kato A, Ohnishi T, Kohmura E, Tohyama M, Yoshimine T* (2000) Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res* 78(1–2): 131–137.  
[https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(00\)00084-x](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(00)00084-x)
  87. *Rapoport SI* (1978) A mathematical model for vasogenic brain edema. *J Theor Biol* 74(3): 439–467.  
[https://doi.org/10.1016/0022-5193\(78\)90224-2](https://doi.org/10.1016/0022-5193(78)90224-2)
  88. *Klatzo I* (1987) Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol* 72(3): 236–239.  
<https://doi.org/10.1007/BF00691095>
  89. *Simard JM, Chen M, Tarasov KV, Bhatta S, Ivanova S, Melnitchenko L, Tsybalyuk N, West GA, Gerzanich V* (2006) Newly expressed SUR1-regulated NC(Ca-ATP) channel mediates cerebral edema after ischemic stroke. *Nat Med* 12(4): 433–440.  
<https://doi.org/10.1038/nm1390>
  90. *Reiter B, Kraft R, Günzel D, Zeissig S, Schulzke JD, Fromm M, Harteneck C* (2006) TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability. *FASEB J* 20(11): 1802–1812.  
<https://doi.org/10.1096/fj.06-5772com>
  91. *Fu X, Li Q, Feng Z, Mu D* (2007) The roles of aquaporin-4 in brain edema following neonatal hypoxia ischemia and reoxygenation in a cultured rat astrocyte model. *Glia* 55(9): 935–941.  
<https://doi.org/10.1002/glia.20515>
  92. *Huang J, Liu B, Yang C, Chen H, Eunice D, Yuan Z* (2013) Acute hyperglycemia worsens ischemic stroke-induced brain damage via high mobility group box-1 in rats. *Brain Res* 1535: 148–155.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.057>
  93. *Tang G, Liu Y, Zhang Z, Lu Y, Wang Y, Huang J, Li Y, Chen X, Gu X, Wang Y, Yang GY* (2014) Mesenchymal stem cells maintain blood-brain barrier integrity by inhibiting aquaporin-4 up-regulation after cerebral ischemia. *Stem Cells* 32(12): 3150–3162.  
<https://doi.org/10.1002/stem.1808>
  94. *Zhiyuan Q, Qingyong L, Shengming H, Hui M* (2016) Protective effect of rhEPO on tight junctions of cerebral microvascular endothelial cells early following traumatic brain injury in rats. *Brain Inj* 30(4): 462–467.  
<https://doi.org/10.3109/02699052.2015.1080386>
  95. *Bramlett HM, Dietrich WD* (2004) Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 24(2): 133–150.  
<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000111614.19196.04>
  96. *Wang TW, Chang KC, Chen LH, Liao SY, Yeh CW, Chuang YJ* (2017). Effects of an injectable functionalized self-assembling nanopeptide hydrogel on angiogenesis and neurogenesis for regeneration of the central nervous system. *Nanoscale* 9(42): 16281–16292.  
<https://doi.org/10.1039/c7nr06528k>
  97. *Hsieh FY, Hsu SH* (2015). 3D bioprinting: A new insight into the therapeutic strategy of neural tissue regeneration. *Organogenesis* 11(4): 153–158.  
<https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1123360>
  98. *Kabadi SV, Hilton GD, Stoica BA, Zapple DN, Faden AI* (2010). Fluid-percussion-induced traumatic brain injury model in rats. *Nat Protoc* 5(9): 1552–1563.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2010.112>
  99. *Chiu CC, Liao YE, Yang LY, Wang JY, Tweedie D, Karnati HK, Greig NH, Wang JY* (2016) Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Methods* 272: 38–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.06.018>
  100. *Das Gupta S, Ciszek R, Heiskanen M, Lapinlampi N, Kukkonen J, Leinonen V, Puhakka N, Pitkänen A* (2021) Plasma miR-9-3p and miR-136-3p as Potential Novel Diagnostic Biomarkers for Experimental and Human Mild Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci* 22(4): 1563.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22041563>
  101. *Komoltsev IG, Sinkin MV, Volkova AA, Smirnova EA, Novikova MR, Kordonskaya OO, Talypov AE, Guekht AB, Krylov VV, Gulyaeva NV* (2020) A Translational Study on Acute Traumatic Brain Injury: High Incidence of Epileptiform Activity on Human and Rat Electroencephalograms and

- Histological Correlates in Rats. *Brain Sci* 10(9): 570.  
<https://doi.org/10.3390/brainsci10090570>
102. *Cho SJ, Park E, Telliyan T, Baker A, Reid AY* (2020) Zebrafish model of posttraumatic epilepsy. *Epilepsia* 61(8): 1774–1785.  
<https://doi.org/10.1111/epi.16589>
  103. *Cheng RK, Jesuthasan SJ, Penney TB* (2014) Zebrafish forebrain and temporal conditioning. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369(1637): 20120462.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0462>
  104. *Gan D, Wu S, Chen B, Zhang J* (2020) Application of the Zebrafish Traumatic Brain Injury Model in Assessing Cerebral Inflammation. *Zebrafish* 17(2): 73–82.  
<https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1793>
  105. *Liu XYE, Park E, Barretto T, Liu E, Ferrier GA, Tavakkoli J, J Baker A* (2020) Effect of Human Umbilical Cord Perivascular Cell-Conditioned Media in an Adult Zebrafish Model of Traumatic Brain Injury. *Zebrafish* 2020 May 20.  
<https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1859>
  106. *Chinwalla A* (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520–562.  
<https://doi.org/10.1038/nature01262>
  107. *Carbonell WS, Maris DO, McCall T, Grady MS* (1998) Adaptation of the fluid percussion injury model to the mouse. *J Neurotrauma* 15(3): 217–229.  
<https://doi.org/10.1089/neu.1998.15.217>

### Models of Traumatic Brain Injury in Zebrafish (*Danio rerio*)

V. Ya. Babchenko<sup>a, b, \*</sup>, A. S. Belova<sup>a, b</sup>, A. A. Bashirzade<sup>a</sup>, M. A. Tikhonova<sup>a, b</sup>,  
 K. A. Demin<sup>c, d, e</sup>, K. N. Zabegalov<sup>f</sup>, E. V. Petersen<sup>g</sup>,  
 A. V. Kalueff<sup>a, b, f, h</sup>, and T. G. Amstislavskaya<sup>a, b, \*\*</sup>

<sup>a</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>b</sup> Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>c</sup> Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>d</sup> Granov Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russia

<sup>e</sup> Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia

<sup>f</sup> Science and Technology University “Sirius”, Sochi, Russia

<sup>g</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

<sup>h</sup> Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

\*e-mail: v.babchenko@g.nsu.ru

\*\*e-mail: amstislavskayatg@physiol.ru

In modern medicine, there is an increased interest in the study of the pathogenesis of traumatic brain injury (TBI). This is dictated primarily by the high level of hospitalizations of patients with this pathology, high mortality, as well as imperfect methods of supervision. To achieve a more in-depth understanding of the pathogenesis of TBI, it is necessary to correctly design the experiment, which in turn begins with the correct selection of an animal model. The zebrafish is considered as a promising organism for studies of molecular events underlying the pathogenesis of TBI. Its advantages as a model organism include a high degree of genetic homology with humans, a relatively low cost, and a high neuroregenerative potential. The pathogenesis of TBI includes a number of processes: primary traumatic injury, neuroinflammation, neurodegeneration, cerebral edema, and neuroregeneration. To date, many of the most important events of the above-mentioned processes have already been established in rodent models. However, the molecular processes of TBI pathogenesis largely remain a mystery to our understanding. This review discusses the experimental models of TBI in zebrafish, their advantages and disadvantages in relation to other model organisms. The review also provides summary data on the pathophysiology and molecular biology of each of the pathogenetic processes of TBI. A number of examples of experimental therapy of TBI in zebrafish are given, reflecting the progress in this area. A conclusion is made about the prospects of using zebrafish as a model object for studies of the pathogenesis of TBI.

**Keywords:** neuroinflammation, neurodegeneration, neuroregeneration, cerebral edema, traumatic brain injury, zebrafish, traumatic brain injury therapy

## ЛИМФАНГИОГЕНЕЗ И ОСОБЕННОСТИ ЛИМФАТИЧЕСКОГО ДРЕНАЖА В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ. ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ СУДЬБЫ ТРАНСПЛАНТАТА

© 2021 г. М. Н. Панькова<sup>1</sup>, \*, Г. И. Лобов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

*\*E-mail: pankova\_mn@infran.ru*

Поступила в редакцию 30.03.2021 г.

После доработки 23.05.2021 г.

Принята к публикации 24.05.2021 г.

Лимфатические сосуды участвуют в ряде физиологических и патологических процессов и обеспечивают поглощение жидкости, иммунных клеток, макромолекул и липидов из интерстициального пространства. Во время операции по трансплантации органов, являющейся единственным вариантом лечения для пациентов с терминальной недостаточностью внутренних органов, непрерывность лимфатических сосудов между трансплантатом и реципиентом полностью нарушается. Несмотря на значительный прогресс в понимании биологии лимфатической системы, все еще остается неясным вклад восстановления лимфатического дренажа в эффективное функционирование/отторжение аллотрансплантатов. Образование лимфатических сосудов после трансплантации происходит путем лимфангиогенеза, и восстановление лимфатической дренажной системы обеспечивает поддержание баланса интерстициальной жидкости в аллотрансплантате, что уменьшает отек ткани. Новообразованные лимфатические сосуды обеспечивают транспорт иммунных клеток, но хорошо известно, что серьезной проблемой при трансплантации органов является иммунное отторжение и воспаление. С одной стороны, лимфатические сосуды облегчают транспорт антигенпрезентирующих клеток к дренирующим лимфатическим узлам и проникновение иммунных эффекторных клеток в трансплантат, ускоряя индукцию аллоиммунитета и последующее отторжение трансплантата. С другой стороны, они обеспечивают путь выхода лимфоцитов и макрофагов из трансплантата, уменьшая воспаление после трансплантации. Степень участия лимфангиогенеза в развитии острого и хронического отторжения значительно различается в разных органах, и знание этих механизмов необходимо для разработки стратегии терапии, обеспечивающей успешное выживание аллотрансплантата. Первая цель данного обзора – описать роль лимфатических сосудов в поддержании гомеостатической функции органов в физиологических условиях, показать сложность процесса лимфангиогенеза, роль различных факторов в протекании этого процесса при трансплантации, учитывая регионарную специфику. Вторая – привлечь внимание специалистов в области трансплантологии к лимфатической системе, ее роли в судьбе трансплантированных органов и необходимости интенсивного изучения процессов лимфангиогенеза при трансплантации органов.

*Ключевые слова:* трансплантация органов, отторжение, лимфатический сосуд, гомеостаз, лимфангиогенез

DOI: 10.31857/S0869813921080094

Несмотря на значительные достижения в области фармакотерапии при различных патологических процессах, в ряде случаев, когда никаких сопоставимых по эффективности альтернатив не существует, только трансплантация донорских органов позволяет спасти жизнь многих людей и восстановить основные функции. История трансплантации органов началась 7 марта 1902 г., когда Ullmann сообщил о пересадке почки собаки с исходного места на шею [1]. Спустя несколько месяцев он также первым выполнил ксенотрансплантацию органа человеку (почка свиньи была пересажена пациенту с уреимией в область локтевого сгиба). В последующем в разных клиниках были проведены сотни трансплантаций различных органов на животных, в процессе выполнения которых были отработаны основные принципы трансплантации органов. Полученный опыт и разработка новых экспериментальных моделей послужили основой для открытия важнейших иммунологических концепций трансплантации, в том числе механизмов отторжения аллотрансплантата и развития методов иммуносупрессии [2].

Первая успешная трансплантация органа от человека к человеку была произведена в декабре 1954 г. в США. Доктор Murray выполнил пересадку почки от живого донора брату-близнецу [3]. Операция была успешной, поскольку, как это мы сейчас хорошо понимаем, у братьев были одинаковые типы HLA, и трансплантированный орган распознавался организмом реципиента как “свой”. В последующие годы информации об иммунном ответе реципиента на несовпадающий HLA донорского органа становилось все больше, что позволило выполнить многочисленные успешные трансплантации сердца, легких, поджелудочной железы и печени [4, 5].

Трансплантация органов принципиально изменила будущее и качество жизни пациентов с терминальной дисфункцией различных органов. История трансплантологии включает большое количество неудач на разных этапах ее развития, однако в последующем, благодаря техническому прогрессу, фармакологической поддержке и инновациям в расширении донорского пула в этой молодой области медицины, было множество хирургических и нехирургических достижений, которые преобразили трансплантацию органов из “экспериментальной” в 1950-х и 60-х годах в современный стандартный метод лечения заболеваний органов-мишеней в терминальной стадии [6].

Согласно данным Всемирного регистра по трансплантации – WHO-ONT [7] все последние годы наблюдается устойчивый рост количества проводимых трансплантаций органов. В 2018 г. их общее количество составило 146840, из них трансплантация почек – 95479, печени – 34074, сердца – 8311, легких – 6475. При трансплантации органов существует несколько серьезных проблем, и если сложные вопросы в области хирургии и микрохирургии в значительной степени решены, то проблема отторжения трансплантата, вызванного развитием иммунных реакций организма, несмотря на проведение иммуносупрессивной терапии, по-прежнему остается актуальной (обзоры [8, 9]). Совершенно очевидна необходимость детального изучения особенностей взаимодействия лимфатической системы реципиента (являющейся морфологической основой иммунной системы и играющей ключевую роль в иммунных процессах) и элементов лимфатической системы трансплантированного органа. Тем не менее, изменения транспортных потоков лимфы, происходящие после трансплантации, до недавнего времени практически не учитывались. Возможность восстановления лимфатического дренажа путем лимфангиогенеза и значение этого процесса для развития реакций отторжения трансплантированного органа изучены слабо.

Функциональное значение лимфатической системы заключается в сохранении тканевого гомеостаза и обусловлено тем, что она играет ведущую роль в поддержании баланса тканевой жидкости, удалении из интерстициального пространства экстравазированных белков, обеспечивает своевременный отток от органов крупномолекулярных метаболитов и транспорт липидов, а также принимает непосред-

ственное участие в осуществлении иммунологического контроля. Ей принадлежит решающая роль в механизмах восстановления после многих патологических процессов и трансплантации органов, т.к., с одной стороны, с помощью лимфатического дренажа происходит очистка тканей от продуктов жизнедеятельности, вирусов, бактерий и токсичных белков, что значительно способствует процессам репарации тканей, с другой стороны, лимфатическая сеть обеспечивает исключительную среду, в которой иммунные клетки могут встречаться и реагировать на чужеродные антигены [10–12].

### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Морфологически лимфатическая система состоит из сети сосудистых структур, в которых образуется лимфа и осуществляется лимфоток, и связанных с ними специализированных лимфоидных органов – лимфатических узлов, где происходят критически важные иммунные реакции. Сеть лимфатических сосудов (ЛС) начинается со слепых лимфатических капилляров (начальных лимфатических сосудов – ЛК), которые являются местом образования лимфы. Сформировавшись, лимфа движется по сети ЛС (преколлекторы, собирающие ЛС, афферентные пренодальные ЛС), направляясь к лимфатическим узлам. В лимфатических узлах множественные пренодальные афферентные ЛС сливаются в узловое субкапсулярное пространство, которое соединяется с лимфатическими синусами, где происходит взаимодействие компонентов лимфы с различными иммунными клетками. Эфферентные лимфатические протоки соединяются с другими пост- и пренодальными ЛС сложной лимфатической сети, в итоге образуя грудной проток, из которого лимфа поступает в крупные вены шеи [13].

Как уже указывалось выше, лимфатическая система осуществляет не только гомеостатические функции, но и является основным участником иммунных реакций. В отличие от кровеносных капилляров, ЛК проницаемы для клеток, и дендритные клетки после контакта с антигеном перемещаются в ЛК и с током лимфы поступают в лимфатические узлы. Процесс перехода лимфоцитов и дендритных клеток из интерстициального пространства в ЛК довольно сложен и регулируется лимфатическими эндотелиальными клетками (ЛЭК), которые являются первыми клетками, вступающими в прямой контакт с периферическими антигенами, цитокинами и иммунными клетками, перемещающимися из периферических тканей в лимфатические узлы. Экспрессия МНС-II мышинными ЛЭК была установлена *in vivo* [14, 15], это свидетельствует о том, что они способны выполнять функцию антигенпрезентирующих клеток, а также контролировать скорость перемещения дендритных клеток и Т-лимфоцитов по ЛС [16], тем самым модулируя начало развития иммунного процесса и его интенсивность, т.е. их роль в адаптивном иммунитете намного шире, чем предполагалось ранее.

Первичные лимфоидные органы (костный мозг и тимус) являются основными структурами, продуцирующими Т- и В-клетки, а вторичные лимфоидные органы (селезенка и лимфатические узлы) – это ключевые органы, в которых происходит созревание Т-клеток, презентация антигенов и запуск адаптивных иммунных реакций. Третичные лимфоидные структуры или органы часто развиваются в очагах хронического воспаления, но также могут быть обнаружены изначально в некоторых органах, таких как легкие (бронх-ассоциированная лимфоидная ткань) и желудочно-кишечный тракт (слизистая-ассоциированная лимфоидная ткань) и могут функционировать как местные иммуномодулирующие структуры. Лимфатические сосуды и вторичные лимфоидные органы расположены таким образом, что это позволяет оптимизировать взаимодействие между антигенами, антигенпрезентирующими клетками и врожденными и адаптивными эффекторными клетками.

Лимфа, отводимая с периферии по афферентным ЛС, в физиологических условиях переносит в лимфатические узлы тканеспецифические аутоантигены, что способствует развитию иммунологической толерантности. При патологии (воспаление, опухоли) в лимфе обнаруживаются различные цитокины и другие сигнальные молекулы, разнообразные пептиды, которые образуются внеклеточно, в том числе в результате местного катаболизма, деградации внеклеточного матрикса, апоптоза и ремоделирования тканей. Многие из перечисленных веществ взаимодействуют с ЛЭК пренодальных ЛС, которые продуцируют различные вещества, действующие на гладкомышечные клетки ЛС. Изменения сократительной активности гладкомышечных клеток под влиянием физиологически активных веществ, содержащихся в оттекаемой лимфе, включая сигнальные молекулы, продуцируемые ЛЭК, приводят к изменению транспортного потока [17].

Общей отличительной особенностью операций по трансплантации органов является отсутствие хирургического соединения ЛС реципиента и трансплантированного органа, что приводит к нарушению лимфодренажа. Поскольку ЛС обеспечивают постоянный отток от тканей избытка интерстициальной жидкости, нарушение их целостности приводит к накоплению жидкости в межклеточном пространстве и отеку трансплантированного органа, что существенно нарушает его стабильное функциональное состояние. С другой стороны, ЛС являются важными путями доставки антигенпрезентирующих клеток и растворимых антигенов, и их повреждение изменяет локальную и системную иммунологию аллотрансплантата, нередко запуская процессы острого и хронического отторжения. Соответственно, восстановление лимфатической сосудистой сети представляется чрезвычайно важным.

### ЛИМФАНГИОГЕНЕЗ

Довольно длительное время данные о молекулярной биологии лимфатической системы, которые позволили бы делать заключения о росте и развитии ЛС, оставались крайне скудными, что было обусловлено трудностями в идентификации и выделении ЛЭК. Согласно устоявшимся представлениям, лимфангиогенез представляет собой процесс роста ЛС, во время которого новые ЛС образуются из уже существующих. В последнее десятилетие наблюдается значительный прогресс в наших возможностях для изучения ремоделирования и регенерации ЛС, в основном, благодаря достижениям в идентификации регуляторных молекул и маркеров, специфичных для лимфатического эндотелия [18–20]. Блокирование каждого из этих маркеров в экспериментах, а также использование контролируемых генетических моделей (нокаутных) мышей позволяет выявить сигнальные пути, определяющие формирование ЛС [21–23].

LYVE-1 один из наиболее специфичных и широко используемых маркеров эндотелия ЛС. Несмотря на то, что LYVE-1 может экспрессироваться в эндотелиальных клетках крупных вен, он является индикатором лимфатической эндотелиальной компетентности [24–27], а его экспрессия – одним из первых признаков начала лимфангиогенеза [28]. LYVE-1 конститутивно экспрессируется как на просветной, так и на аблюминальной поверхности лимфатического эндотелия в нормальных условиях и является рецептором гликозаминогликана гиалуронана (гиалуроновой кислоты) во внеклеточном матриксе [29–31]. Поскольку связывание гиалуроновой кислоты с CD44 может происходить в присутствии LYVE-1 *in vitro* [25], ее LYVE-1-направленная локализация в лимфатических сосудах может обеспечивать субстрат для трансмиграции CD44+ [32]. Принимая во внимание, что внеклеточный матрикс является важным регулятором для морфогенеза ткани и лимфангиогенеза, и взаимодействие с матрицей гиалуронана опосредует миграцию лейкоцитов во время воспаления [29, 32], изменения в экспрессии LYVE-1 будут

отражать прямые функциональные ответы ЛЭК на аллоиммунную реактивность после трансплантации. Учитывая, что молекулярный фенотип собирающих ЛС значительно отличается от ЛК, наличие гладкомышечных клеток в составе стенки сосудов приводит к подавлению LYVE-1 [33]. Собирающие ЛС крысы экспрессируют мРНК LYVE-1 на уровнях, очень похожих, но несколько выше, на таковые в венах, и есть основания полагать, что подавление LYVE-1 за счет контакта с гладкомышечными клетками опосредуется на посттранскрипционном уровне [34], что требует дальнейшего исследования. Дальнейшего изучения требует и вопрос, связанный с функциональной активностью LYVE-1, т.к. в ЛЭК он проявляет относительно низкую аффинность к гиалуронану [31, 34], которая, однако, может меняться, что дает новое понимание молекулярных механизмов, регулирующих взаимодействия лиганда LYVE-1 при воспалении и иммунитете [35].

Подопланин представляет собой небольшой трансмембранный муциноподобный гликопротеин, первоначально описанный в исследованиях, проведенных на подоцитах почек крыс [36]. Он широко экспрессируется в различных тканях и типах клеток, таких как гломерулярные подоциты, альвеолярные клетки I типа, остециты, мезотелиальные клетки, сосудистое сплетение, глиальные клетки, некоторые типы нейронов, эндотелий ЛС, различные типы фибробластов, включая опухолевые клетки [37, 38]. Подопланин участвует в эмбриональном развитии [38–40], а во взрослых тканях играет решающую роль в лимфангиогенезе, продукции тромбоцитов в костном мозге и иммунном ответе [41, 42]. Отсутствие подопланина делает невозможным формирование нормальной лимфатической сосудистой сети [42, 43]. Поскольку не выявлено экспрессии подопланина в кровеносных сосудах, его можно рассматривать как надежный маркер ЛЭК [44]. Однако подопланин присутствует в ЛК, но не в сосудах, которые имеют гладкомышечные клетки в составе своей стенки [45].

Prox1 – это фактор транскрипции, который действует как главный регуляторный белок в развитии ЛЭК. Prox1 расположен в ядре, и его экспрессия является взаимоисключающей с экспрессией маркера кровеносных сосудов PAL-E [46]. Выявление его роли в индукции фенотипа ЛЭК позволило получить доказательства независимости развития кровеносных и лимфатических сосудов [46–48]. В лимфатической системе экспрессия Prox1 наблюдается на всем ее протяжении [34].

Среди всех ангиогенных факторов семейство сосудистых эндотелиальных факторов роста (VEGF) считается основным в новообразовании сосудов. В нормальных физиологических условиях ангиогенез и лимфангиогенез – это строго регулируемые процессы, и факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) и рецепторы к VEGF (VEGFR) являются ключевыми медиаторами этой регуляции. Семейство VEGF объединяет 5 членов: VEGF-A, -B, -C, -D и PlGF (плацентарный фактор роста), которые представляют собой гликопротеины, стимулирующие формирование новых кровеносных и ЛС и увеличивающие проницаемость сосудов. VEGF-A, -B, -C и -D, а также рецепторы VEGF 1, 2 и 3 различаются как по профилям экспрессии, так и по функциям. Механизмы лимфангиогенеза сходны с процессами ангиогенеза, а их реализация не зависит от образования новых кровеносных сосудов. В то же время некоторые факторы роста (VEGF-C и -D) могут взаимодействовать с рецепторами, расположенными как на лимфатических, так и на кровеносных сосудах, таким образом, одновременно стимулируя процессы ангио- и лимфангиогенеза [49]. VEGF-C индуцирует рост, миграцию и выживание первичных ЛЭК [50], а у трансгенных мышей с избыточной экспрессией VEGF-C развивается гиперплазия ЛС [51, 52].

Среди генов, экспрессируемых преимущественно в лимфатическом эндотелии, VEGFR-3 был первым идентифицированным и является ключевым регулятором его развития. VEGFR-3 представляет собой заякоренную в мембране тирозинкиназу, связывающую VEGF-C и VEGF-D, участвующих в лимфангиогенезе [18]. Нейропи-

лин-2 способствует лимфангиогенезу, действуя как корецептор для VEGFR-3 и регулируя его передачу сигналов [53].

Помимо непосредственного участия в лимфангиогенезе, передача сигналов VEGF-C /VEGFR-3 регулирует продукцию хемокинового лиганда CCL21 [54]. Ранее предполагалось, что иммунные клетки пассивно и беспорядочно попадают в афферентные ЛС, однако после идентификации CCR7, высоко экспрессируемого на наивных Т-клетках и зрелых дендритных клетках, было установлено, что данный лиганд регулирует их проникновение [55], в свою очередь, CCL21 участвует в привлечении CCR7 [56]. На экспериментальных моделях трансплантации было показано, что передача сигналов CCL21/CCR7 регулирует перемещение дендритных клеток к вторичным лимфоидным органам, а микроокружение участка трансплантата оказывает сильное влияние на аллоиммунитет и выживаемость трансплантата посредством влияния на данный трафик [57].

VEGF-C и VEGF-D не являются единственными лимфангиогенными факторами, которые стимулируют лимфангиогенез посредством активации VEGFR-3, специфически экспрессируемого на нормальных ЛЭК [58, 59]. Исследования лимфангиогенеза при метастазировании опухолей, в которых эти факторы экспрессировались на чрезвычайно низких уровнях, позволили выявить наличия дополнительных сигнальных систем [44, 60].

Наиболее изучен процесс распространения и прорастания новых ЛС из уже существующих. Явление образования новых ЛС из циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников остается малоизученным, но чрезвычайно важным после трансплантации органа [61]. Ключевую роль в лимфангиогенезе, связанном с отторжением и воспалением, играют макрофаги [62]. Получены данные, что тканевые макрофаги VEGF-3<sup>+</sup> могут трансдифференцироваться в ЛЭК. Кроме того, макрофаги могут косвенно действовать как основной источник VEGF-C и других лимфоангиогенных факторов, которые стимулируют пролиферацию резидентных ЛЭК [63].

### ЛИМФАТИЧЕСКИЙ ДРЕНАЖ СЕРДЦА

Сердце обладает обширной лимфатической сетью, которая представлена ЛК и собирательными ЛС. Она располагается во всех слоях сердца, и в ней различают три капиллярные сети: субэндокардиальную, интрамиокардиальную и субэпикардиальную [64], которые представлены в большем количестве в желудочках, чем в предсердиях [65]. ЛК состоят из тонкого слоя эндотелиальных клеток и образуют относительно плотные сети в виде сетки [65], создавая непрерывное сплетение [66, 67]. Короткие капилляры субэндокардиальной сети погружаются в миокард и вливаются в интрамиокардиальную сеть, капилляры которой переходят в субэпикардиальную сеть. Субэпикардиальная капиллярная сеть, покрывающая поверхность предсердий и желудочков, очень сильно развита и является резервуаром оттока всей лимфы из эндокарда и миокарда [64]. Она лежит в плоскости, параллельной поверхности эндокарда [11]. Наибольшая плотность ЛК наблюдается в ткани сопочковых мышц и области проводящей системы сердца [68].

Начальными путями лимфатического оттока сердца являются преколлекторы, которые представляют собой небольшие клапанные сосуды с нерегулярной прерывистой мускулатурой и берут начало из субэпикардиальной капиллярной сети [66]. Причем, наличие клапанов, пропускающих ток лимфы в одном направлении, и почти полное отсутствие гладкомышечных клеток являются отличительным свойством преколлекторов кардиальной лимфатической системы [66, 67] и обеспечивают функциональную взаимосвязь оттока лимфы с фазами сердечного цикла. Продвижение лимфы по ним обусловлено сокращением сердечной мышцы и зависит от силы систолы и продолжительности диастолы сердца [64, 69].

Собирающие ЛС больше по размеру, но конструктивно похожи на преколлекторы, мышечный слой выражен слабо и не зависит от размера сосуда [66]. Их можно наблюдать, преимущественно, под эпикардом, где они сливаются в лимфатические стволы, которые дренируют все сердце. Собирающие субэпикардальные ЛС желудочков, следуя вдоль артериальных ветвей в направлении от верхушки сердца к его основанию, достигают венечной борозды, где образуют левый и правый венечные стволы. Сюда же открывается и большинство ЛС, дренирующих предсердия. В большинстве случаев отток лимфы из правого и левого коллекторных лимфатических стволов сердца идет по разным направлениям в сложную систему лимфатических узлов средостения [64].

Таким образом, принцип организации путей лимфатического дренажа сердца сходен со структурой расположения кровеносных сосудов, кольца которой во взаимно-перпендикулярных плоскостях обеспечивают циркуляцию в условиях постоянной нестабильности конфигурации сердечной стенки. Эффективность лимфатического оттока зависит как от активного сокращения лимфангионов (активный лимфоотток), так и от сократительной активности миокарда (пассивный лимфоотток): сердечные сокращения обеспечивают внешнее механическое воздействие для эффективного дренажа тканевой жидкости и лимфы, что является важной особенностью, запускающей формирование порочного круга при развитии у пациента хронической сердечной недостаточности того или иного генеза [70].

#### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИМФАТИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СЕРДЦА

Трансплантация сердца в настоящее время является лучшим методом лечения пациентов с сердечной недостаточностью в терминальной стадии. Отдаленный прогноз больных после трансплантации сердца в первую очередь определяется особенностями взаимодействия организма реципиента и трансплантированного органа, проявляющимися отторжением трансплантата. Будучи максимальным в первые месяцы и снижаясь спустя и более год после трансплантации, риск развития отторжения трансплантата сердца сохраняется пожизненно, что определяет необходимость обладать рядом иммуносупрессивной терапией. Однако иммунодепрессанты обладают рядом метаболических, инфекционных, почечных и неопластических побочных эффектов [71] и не предотвращают развитие васкулопатии сердечного аллотрансплантата [72, 73], являющейся основным ограничением долговременной выживаемости трансплантата сердца, которая остается ведущей причиной смертности через 5 лет и более после трансплантации. Гистологически васкулопатия сердечного аллотрансплантата представляет собой сложное взаимодействие между пролиферативными миобластами, макрофагами и Т-лимфоцитами, ведущее к образованию неointимы [73].

После трансплантации сердца наблюдаются изменения цитокиновой среды, возникающие в результате ишемического/реперфузионного повреждения, которое активирует лейкоциты донора (DPL) для миграции из трансплантата [74]. DPL могут перемещаться по кровотоку в селезенку посредством обратной трансмиграции или попасть в дренирующие лимфатические узлы через ЛС. Учитывая отсутствие непрерывности ЛС между донором и реципиентом, DPL, выходящие из донорского трансплантата через разорванные концы донорских ЛС, захватываются ЛК реципиента и направляются к дренирующим лимфатическим узлам реципиента, где они вызывают донор-специфический иммунный ответ, управляемый Т-клетками. В модели гетеротопической трансплантации сердца мышей воссоединение ЛС донора с сосудами реципиента происходит к 4-й неделе после трансплантации [75].

В доклинических моделях было показано, что плотность и размер ЛС в пересаженных сердцах увеличиваются, и большинство ЛС имеют донорское, а не реци-

пиентное происхождение [72, 76]. Были отмечены региональные особенности развития ЛС: плотность внутренней лимфатической ткани миокарда аллотрансплантата снижалась более чем в 30 раз за 1 неделю и восстановилась только до 15% от нативного уровня через 8 недель после трансплантации. Напротив, ЛС аллотрансплантата в эпикарде и рядом с ним не показали значительного снижения плотности, но увеличились в размере более чем в 5 раз через 2 недели и имели примерно 3-кратное увеличение через 8 недель после трансплантации. Лимфатические изменения коррелировали во времени со степенью инфильтрации Т-лимфоцитами и макрофагами в аллотрансплантатах, которая достигла пика через 2–3 недели после трансплантации [77]. Имеющиеся данные, полученные при анализе клинических образцов трансплантата сердца, неоднозначны. Так, в ряде исследований повышенная лимфатическая плотность была связана с отторжением, причем ЛС имели реципиентное происхождение [78]. В других исследованиях с использованием лимфатических маркеров показано, что по сравнению с биопсией через 0.5 мес., плотность ЛС, положительных по LYVE-1 и PROX-1, значительно снижается через 1 мес. после трансплантации и в последующем, а пациенты с умеренным отторжением в течение первых 12 месяцев (ISHLT < IIIa) имели значительно более высокую плотность VEGFR-3 через 0.5 мес. по сравнению с пациентами, по крайней мере, с одним эпизодом клинически значимого отторжения [79]. Таким образом, ЛС миокарда демонстрируют значительное изменение фенотипа эндотелия после трансплантации.

Несмотря на то, что исследование лимфангиогенеза при трансплантации сердца начались относительно недавно, т.е. позже, чем при трансплантации почки или роговицы, к настоящему времени показано, что он вовлечен в процессы отторжения/выживаемости аллотрансплантатов. Связанный с трансплантацией лимфангиогенез сопровождается повышением уровней VEGF-C, основным источником которого являются инфильтрирующие трансплантат макрофаги и CD4<sup>+</sup> Т-клетки [72]. Ишемия, вызывающая повреждение сердечного трансплантата, приводит к усилению передачи сигналов VEGF-C/VEGFR3, увеличивает лимфангиогенез, что повышает экспрессию VEGFR3 и продукцию хемоаттрактанта CCL21 ЛС. VEGF-C может оказывать влияние как на VEGFR-3 + ЛС, так и на VEGFR-3 + антигенпредставляющих клеток в сердечных аллотрансплантатах [72]. Перенос антигенпредставляющих клеток из васкуляризированных аллотрансплантатов во вторичные лимфоидные органы – как селезенку, так и лимфатические узлы – имеет решающее значение для праймирования аллореактивных Т-клеток и развития аллоиммунных ответов [80], и хроническое отторжение увеличивает этот перенос [76, 81]. Данные наблюдения заставляют предположить, что ингибирование лимфангиогенеза может ослабить хроническое отторжение за счет ослабления эфферентного потока донорских антигенпредставляющих клеток в лимфатические узлы реципиента [81].

Завершая краткий обзор об изменениях ЛС в сердце и их значении для судьбы аллотрансплантата, необходимо отметить следующее. Большой объем кровотока в миокарде и высокий уровень метаболизма приводят к образованию в миокарде в физиологических условиях значительного объема лимфы, которая оттекает в ЛС эпикарда и далее – в крупные лимфатические коллекторы. Перевязка крупных отводящих ЛС на животных моделях сопровождается отеком, воспалением и быстро развивающимся обширным фиброзом миокарда и значительным снижением сократительной функции желудочков [82, 83]. После трансплантации сердца и восстановления кровотока в миокарде процессы лимфообразования возобновляются, при этом отток лимфы затруднен. Ухудшение оттока лимфы приводят к возрастанию объема интерстициальной жидкости, отеку миокарда и нарушению метаболических процессов, которые и без того нарушены в результате ишемии-реперфузии. Отек миокарда вследствие отсутствия связи между ЛС трансплантированного сердца и ЛС реципиента после трансплантации сердца с последующим развитием

воспаления является решающим фактором активации процессов раннего отторжения аллотрансплантата. В свою очередь, хроническое отторжение приводит к увеличению лимфатического потока от донорского трансплантата к дренирующему лимфатическому узлу, что может быть фактором, способствующим переносу клеток, аллоиммунитету и васкулопатии сердечного аллотрансплантата.

### ЛИМФАТИЧЕСКИЙ ДРЕНАЖ ПОЧЕК

Почечные ЛС играют важную роль в контроле давления, объема и содержания белка в интерстициальной жидкости, а также участвуют в активации иммунной системы и воспалительных процессов. В общем плане лимфатическая система почек представлена глубокими и поверхностными ЛС, берущими начало от ЛК, образующих две сети. Поверхностная (интракапсулярная) сеть лежит в толще фиброзной капсулы, ее ЛК неправильной формы и неодинакового калибра образуют анастомозы с лимфатической системой почечной паренхимы. Отводящие ЛС поверхностной сети идут к воротам почки, где сливаются с глубокими ЛС, выходящими из почечного синуса [64].

Глубокая (внутрипочечная) лимфатическая сеть находится непосредственно в паренхиме почки и имеет периартериальное расположение. ЛК коркового слоя берут начало (как внутридольковые) в интерстиции рядом с гломерулами — сосуды расположены очень близко, но не проникают внутрь, и следуют рядом с афферентными артериолами и междольковыми артериями. У людей ЛС вокруг междольковых вен более развиты, чем ЛС вокруг междольковых артерий [84]. В межлобулярных ЛС нет клапанов, что позволяет лимфе, сформированной в корковом слое, выходить из почки в любом направлении [85]. Капилляры, расположенные рядом с артериями и венами между дольками почки, соединяются в преколлекторы, образуя дуговые сосуды у основания пирамид, ближе к наружной поверхности коркового слоя количество ЛС снижается. Затем следуют междольковые ЛС почечных столбов, которые окончательно сливаются в лимфатические коллекторы ворот почки [86–88].

Преколлекторы содержат отдельные гладкомышечные клетки, а в собирающих сосудах имеется выраженный слой этих клеток. В преколлекторных — дугобразных и междольковых — ЛС и собирающих (прикорневых) ЛС присутствуют клапаны, которые способствуют однонаправленному потоку к воротам и лимфатическим узлам аорты [89]. ЛС наиболее многочисленны в интерстиции, окружающем междольковые, дугобразные и междольковые артерии и вены. Почти полное отсутствие ЛС в мозговом веществе в почках без патологии, в том числе подтвержденное в исследованиях с подопланином [84], предрасполагает к гипотезе, что жидкость из интерстиция мозгового вещества дренируется ЛК, расположенными рядом с дуговыми артериями и, возможно, междольковыми сосудами [89]. Дренаж жидкости с находящимися в ней веществами из интерстиция мозгового вещества может осуществляться непосредственно в кровеносные сосуды, что показано в экспериментах с введением меченого альбумина [90] и рассчитано с помощью математических моделей [90, 91]. В корковом веществе удаление интерстициального альбумина является основной функцией ЛС, где градиенты онкотического давления необходимы для канальцевой реабсорбции. В мозговом веществе, где удаление его затруднено, образуется пул интерстициального альбумина [85, 92], который участвует в создании онкотического давления и способствует концентрированию мочи.

Взаимосвязь между интракапсулярной и внутрипочечной сетями была наиболее подробно изучена в работе Holmes и соавт. [93], где показано наличие перфорирующих и коммуницирующих ЛС у собак. В этих сосудах имеется клапан, предотвращающий поток лимфы из капсулы в почечную паренхиму. Различный состав лимфы поверхностных и глубоких сосудов [94] отражает отмеченные морфологиче-

ские черты и функциональные особенности дренирования различных отделов почки. Необходимо отметить, что в нормальных условиях большая часть лимфы отводится внутривенной системой [87]. Напротив, при патологических состояниях, таких как обструкция мочеточника, было продемонстрировано увеличение отведения лимфы через интракапсулярную систему [93].

Следуя от ворот почки, одна часть ЛС почки располагается впереди почечной вены, другая – между веной и артерией и третья – позади артерии. Эти группы ЛС почек подходят к поясничным (кавальным или аортальным) лимфатическим узлам. Обе почки также отправляют ЛС кзади от аорты, которые могут вливаться непосредственно в грудной проток. Почечные ЛС могут достигать очень отдаленных узлов, но, в конечном итоге, большая часть лимфы, оттекающей из почки, собирается в *cisterna chyli* [95].

Двумя основными факторами, которые способствуют образованию почечной лимфы, являются объем интерстициальной жидкости и внутривенное венозное давление. Почечный лимфатический приток может быть подавлен в условиях повышенного венозного давления или повышенной проницаемости капилляров. Точно так же почечный лимфатический отток может быть нарушен повышенным центральным венозным давлением. Почечная лимфатическая дисфункция по любой причине приводит к интерстициальному отеку почек [85].

#### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИМФАТИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

Хорошо известными лимфатическими осложнениями трансплантации почки являются развитие у пациентов лимфоцеле и лимфорей. Лимфоцеле – скопление лимфы в забрюшинном пространстве без эпителиальной выстилки [96]. У пациентов с пересаженной почкой лимфоцеле представляет собой псевдокистоз, при котором содержимое лимфы покрыто твердой фиброзной капсулой, часто локализованной вокруг трансплантата [97, 98]. Лимфорей определяется как утечка лимфы из хирургических дренажей или из брюшной стенки через хирургическую рану. По данным ряда авторов, лимфоцеле наблюдается примерно у 0.6–33.9% пациентов, включая бессимптомное протекание [99, 100]. Оно может развиваться в течение от 2 нед. до 6 мес. после трансплантации, с пиком развития через 6 недель [97]. Длительное время считалось, что лимфоцеле является чисто хирургическим осложнением, т.к. снижению его образования способствует перевязка всех основных лимфатических сосудов во время подготовки сосудистого русла к операции. Однако лимфатические осложнения могут быть связаны с такими факторами, как диабет, ожирение, нарушения свертывания крови, использование антикоагулянтов, высоких доз диуретиков, иммунодепрессантов и др. (обзор [101]). Тем не менее, считается, что основным триггером возникновения лимфоцеле является острое отторжение трансплантата [100, 102], связь между которыми была описана достаточно давно и в дальнейшем подтверждена в многочисленных наблюдениях [102].

Хроническое отторжение трансплантата (хроническая трансплантационная нефропатия) остается серьезной проблемой, значительно влияющей на отдаленные результаты пересадки почки. Она указывается как одна из основных причин потерь ренальных аллотрансплантатов и поражает 5% трансплантатов ежегодно [103]. Хроническая трансплантационная нефропатия связана с прогрессирующей атрофией нефронов и рубцеванием трансплантата, которые рассматриваются как последний общий путь разрушения трансплантата с многофакторным патогенезом, который включает вклад прямого аллоантиген-зависимого отторжения и различных аллоантиген-независимых процессов, таких как ишемия-реперфузионное повреждение, системная гипертензия, гиперлипидемия и т.д. [104] Основным проявлением хронической трансплантационной нефропатии является дисфункция

трансплантата, которая на ранней стадии может проявляться стойким нарушением канальцевых функций, а в дальнейшем — в виде хронической почечной недостаточности. Специфичными для хронической трансплантационной нефропатии считаются и изменения стенок мелких сосудов [105, 106].

Отторжение аллотрансплантата, являющееся воспалительным процессом, характеризуется разрастанием сети ЛС, лимфангиогенезом. Регенерация ЛС начинается через 3 дня после трансплантации почки и, хотя характер повторного соединения и эффективность этих новообразованных ЛС остаются малоизученными, приближается к физиологическому состоянию через 2 нед. [107]. Создание эффективной лимфодренажной системы важно для почечной функции, так двусторонняя почечная лимфатическая перевязка на модели крыс приводила к интерстициальному отеку, фиброзу и почечной недостаточности [108]. В то же время имеются данные, что ухудшение функции почек после лечения острого отторжения было связано с экспрессией ЛС в образцах почечного аллотрансплантата [109]. Использование специфических маркеров для ЛЭК (LYVE-1, Prox-1, подопланина) позволило оценить распределение и плотность ЛС в трансплантате почки во время эпизодов острого отторжения [110, 111]. Первоначально развитие новых ЛС в биоптатах почечного аллотрансплантата человека было отмечено у пациентов с острым отторжением почечного трансплантата, где наблюдалось 50-кратное увеличение плотности ЛС в сочетании с внутрпочечными узловыми лимфоидными инфильтратами с признаками активной пролиферации ЛЭК [110]. Неолимфангиогенез был зарегистрирован более чем у половины пациентов с трансплантацией почки. Несмотря на то, что в ряде исследований не было обнаружено значимой разницы в плотности ЛС в биоптатах при остром отторжении, с более низкими его порогом и при хронической трансплантационной нефропатии [111], в других исследованиях продемонстрировано, что аллотрансплантаты, которые подверглись острому клеточному и опосредованному антителами отторжению, вызвали большее увеличение плотности ЛС [112]. В острых фазах отторжения трансплантата, когда имеет место инфильтрация мононуклеарных клеток интерстиция, паттерн распределения ЛС остается неизменным, тогда как в биоптатах аллотрансплантата, содержащих воспалительные инфильтраты, богатые лимфоцитами, их распределение изменяется, достигая канальцево-интерстициального пространства [110, 112]. В биоптатах почечного аллотрансплантата с интерстициальным лимфангиогенезом, который наблюдался примерно в 10% биоптатов и был связан с узловыми лимфоидными инфильтратами, отмечена макрофагальная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов VEGF-C, что предполагает участие макрофагов в лимфангиогенезе [63, 110, 113]. В дальнейшем было подтверждено, что субпопуляция макрофагов, инфильтрирующих трансплантат, является иммунопозитивной в отношении индуцибельной синтазы оксида азота и VEGF-C [114].

Значение индукции лимфангиогенеза путем вовлеченности в этот процесс макрофагов с помощью Toll-подобного рецептора 4 (TLR4), экспрессируемого в ЛЭК, подтверждается тем, что экспрессия TLR4 значительно повышена в почечных аллотрансплантатах пациентов с острым или хроническим отторжением [115]. Высокая периваскулярная лимфатическая плотность связана с благоприятной функцией аллотрансплантата почки. Периваскулярная лимфатическая сеть может участвовать в подавлении фиброза аллотрансплантата и стабилизации функции трансплантата [116].

Терапия, направленная на стимулирование лимфангиогенеза (например, 9-*цис*-ретиноевой кислоты), улучшает состояние отечности тканей на животных моделях лимфедемы и может играть роль в лечении интерстициального отека почек [117, 118]. Однако эти методы лечения могут быть вредными при трансплантации, поскольку ЛС транспортируют антигенпрезентирующие клетки к лимфатическим узлам, а ЛЭК могут инициировать иммунные ответы [118, 119].

Таким образом, влияние лимфангиогенеза на исход после трансплантации почки неоднозначно. Ранний восстановительный лимфангиогенез, который повторно соединяет почку с системной лимфатической системой, может быть полезным за счет восстановления дренажа, который обеспечивает выведение избытка интерстициальной жидкости с растворенными в ней веществами и облегчает удаление инфильтрирующих клеток. Напротив, лимфангиогенез, происходящий на более позднем этапе жизни пересаженной почки может способствовать образованию лимфоидных фолликулов и хронической травме [120].

### ЛИМФАТИЧЕСКИЙ ДРЕНАЖ ЛЕГКИХ

Сеть легочных ЛС осуществляет эффективный дренаж легких, который обеспечивает удаление из них экстравазальной жидкости, мелких частиц и токсичных веществ, что является критически важным для функционирования легких. Лимфатическая система легких состоит из двух сплетений: поверхностного — субплеврального, расположенного в соединительной ткани висцеральной плевры, и глубокого — перибронхо-сосудистого, расположенного в соединительнотканых структурах, окружающих дыхательные пути, легочные артерии и вены. Субплевральная лимфатическая система дренирует субплевральное пространство и максимально развита в нижней доли легкого [121], ее ЛК образуют обширную сетчатую структуру, которая соединяется с общей легочной лимфатической системой. Межалвеолярные ЛК обнаружены в незначительном количестве в межалвеолярных перегородках, полагают, что в нормальных условиях они не играют существенной роли в дренаже интерстициального пространства легкого и предназначены для удаления избытка жидкости в экстремальных условиях [122].

Большинство ЛК располагаются рядом с кровеносными сосудами диаметром 12–15 мкм. Многочисленные небольшие периваскулярные ЛС, которые находятся внутри дольки, вероятно, являются поглощающим отделом системы легких, ответственным за поддержание альвеолярного интерстиция относительно сухим, чтобы обеспечить минимальную толщину воздушно-гематического барьера и, тем самым, оптимизировать диффузию газов. Эндотелиальные клетки ЛК имеют типичную форму дубовых листьев, расположенных черепицеобразно. Основная масса каждого эндотелиоцита прикреплена к окружающему внеклеточному матриксу с помощью якорных (стропных) филаментов, что позволяет ЛК оставаться открытыми даже при повышении интерстициального давления [123]. Далее эти сосуды сливаются в преколлекторы, которые представляют собой начальные лимфодренажные пути и в своей стенке имеют небольшое количество гладкомышечных клеток. Преколлекторы характеризуются наличием участков с чертами ЛК (и, следовательно, обладают абсорбционной способностью) и участков с мышечной оболочкой, которая позволяет продвигать лимфу. Они содержат клапаны, которые препятствуют обратному потоку лимфы. Лимфа из преколлекторов стекает в коллекторные сосуды, имеющие классическое трехслойное строение стенки. В этих сосудах хорошо выражены интима с лимфатическим эндотелием и непрерывной базальной мембраной; медиа, представляющая собой соединительнотканый каркас с хорошо выраженными пучками гладкомышечных клеток; а также адвентиция, состоящая в основном из коллагеновых и эластических волокон с небольшим количеством фибробластов. Эти сосуды, по существу, представляют собой цепочки лимфангионов — лимфатических микросердец, разделенных клапанами и способных эффективно прокачивать лимфу в центрипетальном направлении. Лимфатические коллекторы впадают в лимфатические узлы, которые являются важной частью лимфатической системы легких и грудной клетки в целом. В последующем лимфа по крупным эфферентным сосудам поступает из лимфатических узлов в грудной и правый лимфатические протоки.

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИМФАТИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЛЕГКИХ

Несмотря на то, что показатели результатов трансплантации легких значительно улучшились за последние десятилетия, долгосрочные прогнозы выживаемости и анализ причин гибели аллотрансплантата все еще остаются хуже, чем при трансплантациях других органов [124]. Развитие первичной дисфункции легочного трансплантата в раннем послеоперационном периоде отрицательно влияет на долгосрочную выживаемость пациентов с трансплантированным легким, даже у тех пациентов, у которых не развивается синдром облитерирующего бронхиолита. Реципиенты трансплантата с первичной дисфункцией имеют значительно более высокий риск ранней смертности, более длительного пребывания в отделении интенсивной терапии и увеличения продолжительности пребывания в больнице с уровнем смертности от 17 до 60% в течение 90-дневного периода [125, 126]. Серьезной проблемой при долгосрочном лечении реципиентов является развитие хронической дисфункции аллотрансплантата легкого, развитию которой способствуют как аллоиммунозависимые (отторжение), так и аллоиммунонезависимые факторы [127].

Однако первой проблемой, возникающей при трансплантации легких, является повреждение легочной ткани у трансплантата, вызванное смертью мозга донора [128]. Смерть мозга характеризуется двумя гемодинамическими фазами: вначале массивные симпатические разряды приводят к гипертоническому кризу, за которым следует нейрогенная гипотензия. При этом происходит повышение легочного капиллярного давления и проницаемости капиллярного барьера, разрывы капиллярно-альвеолярной мембраны, а кроме того, значительное увеличение экспрессии нейтрофилов CD11b/CD18 в крови и уровней провоспалительных цитокинов в сыворотке и бронхоальвеолярном лаваже [129], что отрицательно влияет на функцию трансплантата после трансплантации. Показано также, что альвеолярные макрофаги активируются в ответ на гибель мозга, и их длительное присутствие в трансплантатах после трансплантации легких может способствовать задержке жидкости [130]. Полная блокада лимфатического дренажа трансплантата вследствие перерезки ЛС во время трансплантации усугубляет данную ситуацию. По данным, приведенным Khan и соавт. [131], 57% реципиентов испытали некардиогенный отек легких в течение первой недели после трансплантации. Возникающий отек оказывает прямое физическое воздействие на альвеолярное пространство, кроме того, содержащиеся в отечной жидкости альбумин и фибриноген влияют на силы поверхностного натяжения альвеол, вызывая их спадение. Важнейшим фактором повреждения легочной ткани является также накопление короткофрагментной гиалуроновой кислоты, которая в естественных условиях удаляется ЛС [132]. Все эти факторы приводят к значительным изменениям газообменной способности легких, и функция легких неизбежно нарушается. Возникновение отека может быть связано с нарушением лимфатического оттока жидкости [133], и восстановление лимфатического дренажа улучшает ситуацию: клинически отек легких постепенно проходит сам по себе у большинства реципиентов трансплантата легких. Оценка лимфатических потоков у экспериментальных животных показала, что восстановление лимфатического дренажа при отсутствии отторжения происходит через 2 недели после трансплантации легких [134, 135]. Иммуногистохимические исследования на модели мышей с трансплантированным легким продемонстрировали восстановление хорошего лимфатического дренажа путем активного разрастания донорских ЛС в сторону реципиента: ЛС в донорском легком демонстрировали активный рост в течение первых 3 дней после трансплантации с последующим развитием более многочисленных и сложных лимфатических разрастаний и были многочисленными в месте анастомоза к 14-му дню после трансплантации легкого [134].

Экспериментально было продемонстрировано, что отторжение, характеризующееся диффузными инфильтратами мононуклеарных клеток, развивается на более

ранних сроках, т.е. до восстановления лимфатических путей между трансплантатом легкого и реципиентом [135]. Более того, трансплантаты легких в отличие от сердца способны локально обеспечивать подходящую среду для активации аллоиммунных ответов и, следовательно, возникновение отторжения может происходить без участия их лимфатического дренажа [136]. Получены данные, что антигенпредставляющие клетки способны напрямую праймировать Т-клетки в легких, не перемещаясь в дренирующие лимфатические узлы [137].

Помимо реабсорбции интерстициальной тканевой жидкости и транспорта иммунных клеток, ЛС поддерживают равновесие гиалуроновой кислоты, удаляя избыточные продукты ее деградации с помощью рецептора LYVE-1 [31]. Гиалуронан с низкой молекулярной массой играет важную роль в развитии синдрома облитерирующего бронхолигита, который является основным препятствием для долгосрочного выживания, через TLR2/4-зависимые пути приводя к увеличению числа нейтрофилов и аллоантиген-специфичных Т-лимфоцитов, в то время как гиалуронан с высокой молекулярной массой снижает воспаление трансплантата [138]. Нарушение лимфатического дренажа ухудшает клиренс фрагментов гиалуроновой кислоты и приводит к ее накоплению, тогда как индукция терапевтического лимфангиогенеза уменьшает отторжение аллотрансплантата, связанное с ее балансом. При остром отторжении обнаруживаются повышенный апоптоз и сниженная пролиферация в легочном лимфатическом эндотелии в аллогенных легочных трансплантатах, что связано с инициацией аллоиммунных ответов. Было показано, что VEGF-C156S устраняет апоптоз ЛЭК, вызванный отторжением, индуцирует пролиферацию ЛЭК, восстанавливает плотность ЛС и функционирование лимфатической сосудистой сети [135].

В ряде исследований показано, что легкие могут являться потенциальным “лимфоидным органом”, т.к. пересаженные легкие мыши развивают третичную лимфоидную ткань или лимфоидный неогенез [139, 140], это приводит к предположению, что такая внутрилегочная лимфоидная ткань дополняет роль вторичных лимфоидных органов. С одной стороны, она может вносить вклад в местную продукцию специфических для донора антител [141], с другой, может играть защитную или регулируемую роль в иммунном ответе в сочетании с FoxP3 + регуляторными Т-клетками [142], либо опосредованную В-клетками, продуцирующими интерлейкин-10 [143]. Таким образом, постоянные или частые воспалительные стимулы, а также рефрактерные или повторяющиеся эпизоды отторжения, вероятно, будут способствовать созданию провоспалительной среды в легких. Напротив, долговременная стабилизация трансплантата без отторжения, инфекции или других негативных эпизодов даже после развития лимфоидной ткани *de novo*, может привести к созданию противовоспалительной или регуляторной среды в легких аллотрансплантата.

К настоящему времени нет доказательств, что формирование анастомозов между ЛС легочного трансплантата и ЛС реципиента может быть полезным для выживания трансплантированных легких, но есть основание сделать определенные предположения. Доклинические исследования трансплантации тонкой кишки, когда ЛС трансплантата и реципиента сшивались, показали, что микрохирургическая лимфатическая реконструкция значительно улучшает долгосрочную выживаемость трансплантатов [144]. Легкие, подобно желудочно-кишечному тракту, постоянно подвергаются воздействию разнообразных чужеродных антигенов. Демонстрация эффективности лимфатического анастомоза при трансплантации кишечника позволяет предположить, что формирование лимфатических анастомозов может обеспечить определенные преимущества и при трансплантации легких. Помимо этого, в качестве действенной терапевтической стратегии для улучшения результатов при трансплантации легких также может служить быстрое восстановление физиологического легочного лимфатического дренажа с помощью мощных пролимфангиогенных факторов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие такого важного направления в медицине, как трансплантация органов, определяется комплексом самых разных факторов, в т.ч. социальными и юридическими (подбор доноров), обучением специалистов и развитием микрохирургической техники, разработкой методик забора и консервации органов, профилактики и ранней диагностики первичной и вторичной дисфункции аллотрансплантатов. К сожалению, такой физиологический аспект трансплантологии, как необходимость формирования в процессе операции единой лимфатической сосудистой сети трансплантата и реципиента, пока остается за пределами интересов большинства врачей. Между тем, пересечение всех ЛС трансплантата сопровождается выраженным нарушением его гомеостаза (нарушается резорбция и транспорт жидкости, макромолекул и липидов из интерстициального пространства, транспорт иммунных клеток), что приводит к отеку и развитию воспаления, а последнее является важнейшим фактором активации иммунных реакций и отторжения аллотрансплантата. Необходимость восстановления лимфатического дренажа трансплантированного органа очевидна, однако степень участия лимфангиогенеза в развитии острого и хронического отторжения значительно различается в разных органах. Знание этих особенностей необходимо для создания эффективной методики формирования единой лимфатической сети трансплантированного органа и реципиента (формирование анастомозов ЛС во время операции или последующая индукция/подавление лимфангиогенеза), а вопросы, связанные с ним, требуют дальнейших всесторонних исследований.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственной Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства (47\_П0\_ДРиОК)”.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

Определение цели и структуры статьи, редактирование – Г.И.Л.

Написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи – М.Н.П.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hatzinger M, Stastny M, Grützmacher P, Sohn M* (2016) Die Geschichte der Nierentransplantation [The history of kidney transplantation]. *Der Urologe* 55: 1353–1359. <https://doi.org/10.1007/s00120-016-0205-3>
2. *Medawar PB* (1945) A second study of the behaviour and fate of skin homografts in rabbits; a report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat* 79: 157–176.
3. *Murray JE, Merrill JP, Harrison JH* (1958) Kidney Transplantation Between Seven Pairs of Identical Twins. *Ann Surg* 148: 343–357. <https://doi.org/10.1097/0000658-195809000-00004>
4. *Hardy JD* (1999) The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc* 31: 25–29. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(98\)02059-4](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(98)02059-4)
5. *White SA, Shaw JA, Sutherland DE* (2009) Pancreas transplantation. *The Lancet* 373: 1808–1817. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60609-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60609-7)
6. *Barker CF, Markmann JF* (2013) Historical Overview of Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a014977. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014977>
7. International report on organ donation transplantation activity. Executive summary 2018. In: WHO-ONT.

- <http://www.transplant-observatory.org/global/>. Accessed October 2020  
<http://www.transplant-observatory.org/wp-content/uploads/2020/10/glorep2018-2.pdf>
8. *Béland S, Désy O, Vallin P, Basoni C, De Serres SA* (2015) Innate immunity in solid organ transplantation: an update and therapeutic opportunities. *Expert Rev Clin Immunol* 11: 377–389. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2015.1008453>
  9. *Lakkis FG, Li XC* (2018) Innate allorecognition by monocytic cells and its role in graft rejection. *Am J Transplant* 18: 289–292. <https://doi.org/10.1111/ajt.14436>
  10. *Padera TP, Meijer EF, Munn LL* (2016) The Lymphatic System in Disease Processes and Cancer Progression. *Annu Rev Biomed Eng* 18: 125–158. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-112315-031200>
  11. *Breslin JW, Yang Y, Scallan JP, Sweat RS, Adderley SP, Murfee WL* (2018) Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology. *Compr Physiol* 9: 207–299. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180015>
  12. *Oliver G, Kipnis J, Randolph GJ, Harvey NL* (2020) The Lymphatic Vasculature in the 21st Century: Novel Functional Roles in Homeostasis and Disease. *Cell* 182: 270–296. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.039>
  13. *Лобов ГИ, Непиушчих ЖВ* (2020) Структура и физиология лимфатической сосудистой сети. Регионарн кровообр и микроцирк 19: 5–18. [*Lobov GI, Nepiyushchikh ZV* (2020) Structure and physiology of the lymphatic vasculature. *Region Blood Circulat and Microcirculat* 19: 5–18 (In Russ)]. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2020-19-3-5-18>
  14. *Cohen JN, Guidi CJ, Tewalt EF, Qiao H, Rouhani SJ, Ruddell A, Farr AG, Tung KS, Engelhard VH* (2010) Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J Exp Med* 207: 681–688. <https://doi.org/10.1084/jem.20092465>
  15. *Tewalt EF, Cohen JN, Rouhani SJ, Guidi CJ, Qiao H, Fahl SP, Conaway MR, Bender TP, Tung KS, Vella AT, Adler AJ, Chen L, Engelhard VH* (2012) Lymphatic endothelial cells induce tolerance via PD-L1 and lack of costimulation leading to high-level PD-1 expression on CD8 T cells. *Blood* 120: 4772–4782. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-427013>
  16. *Russo E, Teixeira A, Vaahromeri K, Willrodt AH, Bloch JS, Nitschké M, Santambrogio L, Kerjaszki D, Sixt M, Halin C* (2016) Intralymphatic CCL21 promotes tissue egress of dendritic cells through afferent lymphatic vessels. *Cell Rep* 14: 1723–1734. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.048>
  17. *Орлов РС, Борисова РП, Бубнова НА, Гашев АА, Ерофеев НП, Лобов ГИ, Панькова МН, Петунов СГ* (1991) Лимфатические сосуды: тонус, моторика, регуляция. Физиол журн СССР им ИМ Сеченова 77: 140–149. [*Orlov RS, Borisova RP, Bubnova NA, Gashev AA, Erofeev NP, Lobov GI, Pan'kova MN, Petunov SG* (1991) The lymphatic vessels: their tonus, motility and regulation. *Fiziol Zh SSSR im IM Sechenova* 77: 140–149 (In Russ)].
  18. *Wolf K, Hu H, Isaji T, Dardik A* (2019) Molecular identity of arteries, veins, and lymphatics. *J Vasc Surg*. 69: 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2018.06.195>
  19. *Kato S, Shimoda H, Ji RC, Miura M* (2006) Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anat Sci Int* 81: 71–83. <https://doi.org/10.1111/j.1447-073X.2006.00142.x>
  20. *Zheng W, Aspelund A, Alitalo K* (2014) Lymphangiogenic factors, mechanisms, and applications. *J Clin Invest* 124(3): 878–887. <https://doi.org/10.1172/JCI171603>
  21. *Martinez-Corral I, Stanczuk L, Frye M, Ulmar MH, Diéguez-Hurtado R, Olmeda D, Makinen T, Ortega S* (2016) Vegfr3-CreER (T2) mouse, a new genetic tool for targeting the lymphatic system. *Angiogenesis* 19: 433–445. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9505-x>
  22. *Pham TH, Baluk P, Xu Y, Grigorova I, Bankovich AJ, Pappu R, Coughlin SR, McDonald DM, Schwab SR, Cyster JG* (2010) Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. *J Exp Med* 207: 17–27. <https://doi.org/10.1084/jem.20091619>
  23. *Wong BW, Wang X, Zecchin A, Thienpont B, Cornelissen I, Kalucka J, García-Caballero M, Misiainen R, Huang H, Brining U, Blacher S, Vinckier S, Goveia J, Knobloch M, Zhao H, Dierkes C, Shi C, Hägerling R, Moral-Dardé V, Wyns S, Lippens M, Jessberger S, Fendt SM, Lutun A, Noel A, Kiefer F, Ghesquière B, Moons L, Schoonjans L, Dewerchin M, Eelen G, Lambrechts D, Carmeliet P* (2017) The role of fatty acid beta-oxidation in lymphangiogenesis. *Nature* 542: 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature21028>
  24. *Jackson D* (2003) The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med* 13: 1–7. [https://doi.org/10.1016/s1050-1738\(02\)00189-5](https://doi.org/10.1016/s1050-1738(02)00189-5)
  25. *Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG* (1999) LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell*

- Biol 144:789-801.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.789>
26. *Jurisc G, Detmar M.* (2009) Lymphatic endothelium in health and disease. *Cell Tissue Res* 335: 97–108.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-008-0644-2>
  27. *Maby-El Hajjami H, Petrova TV.* (2008) Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochem Cell Biol* 130: 1063–1078.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-008-0525-5>
  28. *Escobedo N, Oliver G* (2016) Lymphangiogenesis: origin, specification, and cell fate determination. *Annu Rev Cell Dev Biol* 32: 677–691.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-124944>
  29. *Ji RC* (2006) Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. *Lymphat Res Biol* 4: 83–100.  
<https://doi.org/10.1089/lrb.2006.4.83>
  30. *Lee JY, Spicer AP* (2000) Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 12: 581–586.  
[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00135-6](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00135-6)
  31. *Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG* (2001) Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem* 276: 19420–19430.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M011004200>
  32. *Jackson DG* (2004) Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS* 112: 526–538.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0811.x>
  33. *Tammela T, Saaristo A, Holopainen T, Lyytikka J, Kotronen A, Pitkonen M, Abo-Ramadan U, Yla-Hertuala S, Petrova TV, Alitalo K* (2007) Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med* 13: 1458–1466.  
<https://doi.org/10.1038/nm1689>
  34. *Bridenbaugh EA, Wang W, Srimushnam M, Cromer WE, Zawieja SD, Schmidt SE, Jupiter DC, Huang HC, Van Buren V, Zawieja DC* (2013) An immunological fingerprint differentiates muscular lymphatics from arteries and veins. *Lymphat Res Biol*. 11: 155–171.  
<https://doi.org/10.1089/lrb.2013.0023>
  35. *Lawrance W, Banerji S, Day AJ, Bhattacharjee S, Jackson DG* (2016) Binding of Hyaluronan to the Native Lymphatic Vessel Endothelial Receptor LYVE-1 Is Critically Dependent on Receptor Clustering and Hyaluronan Organization. *J Biol Chem* 291: 8014–8030.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708305>
  36. *Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D* (1997) Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 151: 1141–1152.
  37. *Ordóñez NG* (2006) Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol* 13: 83–88.  
<https://doi.org/10.1097/01.pap.0000213007.48479.94>
  38. *Quintanilla M, Montero-Montero L, Renart J, Martín-Villar E* (2019) Podoplanin in Inflammation and Cancer. *Int J Mol Sci* 20: 707.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20030707>
  39. *Mahtab EA, Vicente-Steijn R, Hahurij ND, Jongbloed MR, Wisse LJ, DeRuiter MC, Uhrin P, Zaujec J, Binder BR, Schaliq MJ, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC* (2009) Podoplanin deficient mice show a RhoA-related hypoplasia of the sinus venosus myocardium including the sinoatrial node. *Dev Dyn* 238: 183–193.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21819>
  40. *Renart J, Carrasco-Ramirez P, Fernandez-Munoz B, Martin-Villar E, Montero L, Yurrita MM, Quintanilla M* (2015) New insights into the role of podoplanin in epithelial-mesenchymal transition. *Int Rev Cell Mol Biol* 317: 185–239.  
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.009>
  41. *Astarita JL, Acton SE, Turley SJ* (2012) Podoplanin: Emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol* 3: 283.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00283>
  42. *Navarro-Nunez L, Langan SA, Nash GB, Watson SP* (2013) The physiological and pathophysiological roles of platelet CLEC-2. *Thromb Haemost* 109: 991–998.  
<https://doi.org/10.1160/TH13-01-0060>
  43. *Pan Y, Xia L* (2015) Emerging roles of podoplanin in vascular development and homeostasis. *Front Med* 9: 421–430.  
<https://doi.org/10.1007/s11684-015-0424-9>
  44. *Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, Harris AL, Dirix LY, Vermeulen PB* (2006) First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 95: 1611–1625.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603445>

45. *Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K* (2002) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2: 573–583.  
<https://doi.org/10.1038/nrc863>
46. *Wilting J, Papoutsi M, Christ B, Nicolaides KH, von Kaisenberg CS, Borges J, Stark GB, Alitalo K, Tomarev SI, Niemeyer C, Rössler J* (2002) The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. *FASEB J* 16: 1271–1273.  
<https://doi.org/10.1096/fj.01-1010fje>
47. *Wigle JT, Oliver G* (1999) Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98: 769–778.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81511-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81511-1)
48. *Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, Oliver G* (2002) Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 225: 351–357.  
<https://doi.org/10.1002/dvdy.10163>
49. *Alitalo K, Carmeliet P* (2002) Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cells* 4: 219–226.  
[https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00051-x](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00051-x)
50. *Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K* (2001) Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *Embo J* 20: 4762.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4762>
51. *Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K* (2001) Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *Embo J* 20: 1223–1231.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1223>
52. *Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K* (1997) Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 276: 1423.  
<https://doi.org/10.1126/science.276.5317.1423>
53. *Deng Y, Zhang X, Simons M* (2015) Molecular controls of lymphatic VEGFR3 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35: 421–429.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304881>
54. *Iwami D, Brinkman CC, Bromberg JS* (2015) Vascular endothelial growth factor c/vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling regulates chemokine gradients and lymphocyte migration from tissues to lymphatics. *Transplantation* 99: 668–677.  
<https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000561>
55. *Bromley SK, Thomas SY, Luster AD* (2005) Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nature Immunol* 6: 895.  
<https://doi.org/10.1038/ni1240>
56. *Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A* (2008) CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Rev Immunol* 8: 362–371.  
<https://doi.org/10.1038/nri2297>
57. *Hua J, Stevenson W, Dohman TH, Inomata T, Tahvildari M, Calcagno N, Pirmadjid N, Sadrai Z, Chauhan SK, Dana R* (2016) Graft Site Microenvironment Determines Dendritic Cell Trafficking Through the CCR7-CCL19/21 Axis. *Invest Ophthalmol & Vis Sci* 57: 1457–1467.  
<https://doi.org/10.1167/iovs.15-17551>
58. *Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J* (1997) VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 188: 96–109.  
<https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8639>
59. *Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA* (1998) Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 $\alpha$  (Flk1) and VEGF receptor 3 $\alpha$  (Flt4). *PNAS* 95: 548–553.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.548>
60. *Cao Y* (2005) Direct role of PDGF-BB in lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cell Cycle* 4: 228–230.  
<https://doi.org/10.4161/cc.4.2.1419>
61. *Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, Kubista E, Hausmaninger H, Samonigg H, Gnant M, Jakesz R, Horvat R, Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group* (2004). Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Annals Surgery* 240: 306–312.  
<https://doi.org/10.1097/01.sla.0000133355.48672.22>
62. *Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, Van Rooijen N, Takenaka H, D'Amore PA, Stein-Streilein J, Losordo DW, Streilein JW* (2005) Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest* 115: 2363.  
<https://doi.org/10.1172/JCI23874>
63. *Kerjaschki D, Huttary N, Raab I, Regele H, Bojarski-Nagy K, Bartel G, Kröber SM, Greinix H, Rosenmaier A, Karlhofer F, Wick N, Mazal PR* (2006) Lymphatic endothelial progenitor cells

- contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants. *Nat Med* 12: 230–234. <https://doi.org/10.1038/nm1340>
64. *Жданов ДА* (1952) Общая анатомия и физиология лимфатической системы. Л. Медгиз. [*Jdanov DA* (1952) *Obshhaja anatomija i fiziologija limfaticeskoj sistemy* [General anatomy and physiology of the lymphatic system] L. Medgiz (In Russ)].
  65. *Shimada T, Morita T, Oya M, Kitamura H* (1990) Morphological studies of the cardiac lymphatic system. *Arch Histol Cytol* 53 Suppl: 115–126. [https://doi.org/10.1679/aohc.53.suppl\\_115](https://doi.org/10.1679/aohc.53.suppl_115)
  66. *Sacchi G, Weber E, Aglianò M, Cavina N, Comparini L* (1999). Lymphatic vessels of the human heart: precollectors and collecting vessels. A morpho-structural study. *J Submicroscopic Cytol Pathol* 31: 515–525 PMID: .10685392
  67. *Ratajska A, Gula G, Flaht-Zabost A, Czarnowska E, Ciszek B, Jankowska-Steifer E, Niderla-Bielinska J, Radoska-Lesniewska D* (2014) Comparative and developmental anatomy of cardiac lymphatics. *Scient World J* 2014: 183170. <https://doi.org/10.1155/2014/183170>
  68. *Cui Y* (2010) The role of lymphatic vessels in the heart. *Pathophysiology* 17: 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2009.07.006>
  69. *Scherter ER, Daye RM, McClure DE, Lai T, Miyamoto M, Myerowitz PD* (1997) Mechanical workload-myocardial water content relationship in isolated rat hearts. *Am J Physiol* 273: H271–H278. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.1.H271>
  70. *Dashkevich A, Hagl C, Beyersdorf F, Nykänen AI, Lemström KB* (2016) VEGF Pathways in the Lymphatics of Healthy and Diseased Heart. *Microcirculation* 23: 5–14. <https://doi.org/10.1111/micc.12220>
  71. *Sayegh MH, Carpenter CB* (2004) Transplantation 50 years later - progress, challenges, and promises. *N Engl J Med*. 23: 2761–2766. <https://doi.org/10.1056/NEJMon043418>
  72. *Nykänen AI, Sandelin H, Krebs R, Keränen MA, Tuuminen R, Kärpänen T, Wu Y, Pytowski B, Koskinen PK, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Lemström KB* (2010) Targeting Lymphatic Vessel Activation and CCL21 Production by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 Inhibition Has Novel Immunomodulatory and Antiarteriosclerotic Effects in Cardiac Allografts. *Circulation* 121: 1413–1422. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.910703>
  73. *Hasegawa T, Visovatti SH, Hyman MC, Hayasaki T, Pinsky DJ* (2007) Heterotopic vascularized murine cardiac transplantation to study graft arteriopathy. *Nat Protoc* 2: 471–480. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.48>
  74. *Beland S, Desy O, Vallin P, Basoni C, De Serres SA* (2015) Innate immunity in solid organ transplantation: an update and therapeutic opportunities. *Expert Rev Clin Immunol* 11: 377–389. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2015.1008453>
  75. *Brown K, Badar A, Sunassee K, Fernandes MA, Shariff H, Jurcevic S, Blower PJ, Sacks SH, Mul-len GE, Wong W* (2011) SPECT/CT lymphoscintigraphy of heterotopic cardiac grafts reveals novel sites of lymphatic drainage and T cell priming. *Am J Transplant* 11: 225–234. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03388.x>
  76. *Edwards LA, Nowocin AK, Jafari N V, Meader LL, Brown K, Sarde A, Lam C, Murray A, Wong W* (2018) Chronic Rejection of Cardiac Allografts Is Associated With Increased Lymphatic Flow and Cellular Trafficking. *Circulation* 137: 488–503. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028533>
  77. *Soong TR, Pathak AP, Asano H, Fox-Talbot K, Baldwin WM 3rd* (2010). Lymphatic injury and regeneration in cardiac allografts. *Transplantation* 89: 500–508. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181c73c34>
  78. *Jonigk D, Lehmann U, Stuht S, Wilhelmi M, Haverich A, Kreipe H, Mengel M* (2007) Recipient-derived neoangiogenesis of arterioles and lymphatics in quilty lesions of cardiac allografts. *Transplantation* 84: 1335–1342. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000287458.72440.75>
  79. *Geissler HJ, Dashkevich A, Fischer UM, Fries JW, Kuhn-Régnier F, Addicks K, Mehlhorn U, Bloch W* (2006) First year changes of myocardial lymphatic endothelial markers in heart transplant recipients. *Eur J Cardiothorac Surg* 29: 767–771. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2005.12.024>
  80. *Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y* (2000) Immunologic “ignorance” of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 6: 686–688. <https://doi.org/10.1038/76267>
  81. *Baldwin HS, Drakos SG* (2018) Lymphangiogenesis in Chronic Rejection and Coronary Allograft Vasculopathy. *Circulation* 137: 504–507. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031716>
  82. *Kong XQ, Wang L, Kong DG* (2007) Cardiac lymphatic interruption is a major cause for allograft failure after cardiac transplantation. *Lymphat Res Biol* 5: 45–47. <https://doi.org/10.1089/lrb.2007.5108>

83. *Brakenhielm E, González A, Díez J* (2020) Role of Cardiac Lymphatics in Myocardial Edema and Fibrosis: JACC Review Topic of the Week. *J Am College Cardiol* 76: 735–744. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.05.076>
84. *Ishikawa Y, Akasaka Y, Kiguchi H, Akishima-Fukasawa Y, Hasegawa T, Ito K, Kimura-Matsumoto M, Ishiguro S, Morita H, Sato S, Soh S, Ishii T* (2006) The human renal lymphatics under normal and pathological conditions. *Histopathology* 49: 265–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02478.x>
85. *Russell PS, Hong J, Windsor JA, Itkin M, Phillips ARJ* (2019) Renal Lymphatics: Anatomy, Physiology, and Clinical Implications. *Front Physiol* 10: 251. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00251>
86. *Cuttino JT, Clark RL, Charles Jennette J* (1989) Microradiographic demonstration of human intrarenal microlymphatic pathways. *Urol Radiol* 11: 83–87. <https://doi.org/10.1007/BF02926482>
87. *McIntosh GH, Morris B* (1971) The lymphatics of the kidney and the formation of renal lymph. *J Physiol* 214: 365. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009438>
88. *Lee HW, Qin YX, Kim YM, Park EY, Hwang JS, Huo GH, Yang CW, Kim WY, Kim J* (2011) Expression of lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 in the developing mouse kidney. *Cell Tissue Res* 343: 429–444. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1098-x>
89. *Seeger H, Bonani M, Segerer S* (2012) The role of lymphatics in renal inflammation. *Nephrol Dialysis Transpl* 27: 2634–2641. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs140>
90. *Tenstad O, Heyeraas KJ, Wiig H, Aukland K* (2001) Drainage of plasma proteins from the renal medullary interstitium in rats. *J Physiol* 536: 533–539. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0533c.xd>
91. *Wang W, Michel CC* (2000) Modeling exchange of plasma proteins between microcirculation and interstitium of the renal medulla. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F334–F344. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.2.F334>
92. *Slotkoff LM, Lilienfield LS* (1967) Extravascular renal albumin. *Am J Physiol* 212: 400–406. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1967.212.2.400>
93. *Holmes MJ, O'Morchoe PJ, O'Morchoe CC* (1977) Morphology of the intra-renal lymphatic system. Capsular and hilar communications. *Am J Anat* 149: 333–352. <https://doi.org/10.1002/aja.1001490303>
94. *O'morchoe CC, Omorchoe PJ, Donati EJ* (1975) Comparison of hilar and capsular renal lymph. *Am J Physiol*. 229: 416–421. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1975.229.2.416>
95. *Cockett AT* (1977) Lymphatic network of kidney I. Anatomic and physiologic considerations. *Urology* 9: 125–129. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(77\)90180-7](https://doi.org/10.1016/0090-4295(77)90180-7)
96. *Heyman JH, Orron DE, Leiter E* (1989) Percutaneous management of postoperative lymphocele. *Urology* 34: 221–224. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(89\)90378-6](https://doi.org/10.1016/0090-4295(89)90378-6)
97. *Ebadzadeh MR, Tavakkoli M* (2008) Lymphocele after kidney transplantation. Where are we standing now? *Urology* 5: 144–148. <https://doi.org/10.22037/uj.v5i3.5>
98. *Lima ML, Cotrim CA, Moro JC, Miyaoka R, D'Ancona CA* (2012) Laparoscopic treatment of lymphoceles after renal transplantation. *Int Braz J Urol* 38: 215–221. <https://doi.org/10.1590/s1677-55382012000200009>
99. *Howard RJ, Simmons RL, Najarian JS* (1976) Prevention of lymphoceles following renal transplantation. *Ann Surg* 184: 166–168. <https://doi.org/10.1097/0000658-197608000-00005>
100. *Khauil RB, Stoff JS, Lovewell T, Ghavamian R, Baker S* (1993) Post-transplant lymphoceles: A critical look into the risk factors, pathophysiology and management. *J Urol* 150: 22–26. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)35387-9](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)35387-9)
101. *Ranghino A, Segoloni GP, Lasaponara F, Biancone L* (2015) Lymphatic disorders after renal transplantation: new insights for an old complication. *Clin Kidney J* 8: 615–622. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfv064>
102. *Choudhrie AV, Kumar S, Gnanaraj L, Devasia A, Chacko N, Kekre NS* (2012) Symptomatic lymphocele post renal transplant. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 23: 1162–1168. <https://doi.org/10.4103/1319-2442.103554>
103. *Ponticelli C, Villa M, Cesana B, Montagnino G, Tarantino A* (2002) Risk factors for late kidney allograft failure. *Kidney Int* 62: 1848. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00612.x>
104. *Yates PJ, Nicholson ML* (2006) The aetiology and pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *Transpl Immunol* 16: 148. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2006.10.001>

105. Paul LC (1995) Chronic renal transplant loss. *Kidney Int* 47: 1491–1499.  
<https://doi.org/10.1038/ki.1995.211>
106. Colvin R (1996) The renal allograft biopsy. *Kidney Int* 50: 1069–1082.  
<https://doi.org/10.1038/ki.1996.410>
107. Mobley JE, O'Dell RM (1967) The role of lymphatics in renal transplantation. Renal lymphatic regeneration. *J Surg Res* 7: 231.  
[https://doi.org/10.1016/0022-4804\(67\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0022-4804(67)90057-1)
108. Zhang T, Guan G, Liu G, Sun J, Chen B, Li X, Hou X, Wang H (2008) Disturbance of lymph circulation develops renal fibrosis in rats with or without contralateral nephrectomy. *Nephrology* 13: 128.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00851.x>
109. Oka K, Namba Y, Ichimaru N, Moriyama T, Kyo M, Kokado Y, Imai E, Takahara S (2009) Clinicopathological study of expression of lymphatic vessels in renal allograft biopsy after treatment for acute rejection. *Transplant Proc* 41: 4154–4158.  
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.09.067>
110. Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, Birner P, Krieger S, Hovorka A, Silberhumer G, Laakkonen P, Petrova T, Langer B, Raab I (2004) Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol* 15: 603.  
<https://doi.org/10.1097/01.asn.0000113316.52371.2e>
111. Stuhrt S, Gwinner W, Franz I, Schwarz A, Jonigk D, Kreipe H, Kerjaschki D, Haller H, Mengel M (2007) Lymphatic neoangiogenesis in human renal allografts: results from sequential protocol biopsies. *Am J Transplant* 7: 377–384.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01638.x>
112. Yamamoto I, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Hosoya T, Horita S, Tanabe K, Fuchinoue S, Teraoka S, Toma H (2006) A pathological analysis of lymphatic vessels in early renal allograft. *Transplant Proc* 38: 3300–3303.  
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.10.095>
113. Elahi MM, Matata BM, Hakim NS (2006) Quiescent interplay between inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$ : influence on transplant graft vasculopathy in renal allograft dysfunction. *Exp Clin Transplant* 4: 445–450. PMID: .16827641
114. Adair A, Mitchell DR, Kipari T, Qi F, Bellamy CO, Robertson F, Hughes J, Marson LP (2007) Peritubular capillary rarefaction and lymphangiogenesis in chronic allograft failure. *Transplantation* 83:1542–1550.  
<https://doi.org/10.1097/01.tp.0000266689.93615.cd>
115. Kwon J, Park J, Lee D, Kim YS, Jeong HJ (2008) Toll-like receptor expression in patients with renal allograft dysfunction. *Transplant Proc* 40: 3479.  
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.06.073>
116. Tsuchimoto A, Nakano T, Hasegawa S, Masutani K, Matsukuma Y, Eriguchi M, Nagata M, Nishiki T, Kitada H, Tanaka M, Kitazono T, Tsuruya K (2016) The potential role of perivascular lymphatic vessels in preservation of kidney allograft function. *Clin Exp Nephrol* 21: 721–731.  
<https://doi.org/10.1007/s10157-016-1338-9>
117. Choi I, Lee S, Kyoung Chung H, Suk Lee Y, Eui Kim K, Choi D, Park EK, Yang D, Ecoiffier T, Monahan J, Chen W, Aguilar B, Lee HN, Yoo J, Koh CJ, Chen L, Wong AK, Hong YK (2012) 9-cis retinoic acid promotes lymphangiogenesis and enhances lymphatic vessel regeneration: therapeutic implications of 9-cis retinoic acid for secondary lymphedema. *Circulation* 125: 872–882.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.030296>
118. Yazdani S, Navis G, Hillebrands J-L, van Goor H, van den Born J (2014) Lymphangiogenesis in renal diseases: passive bystander or active participant? *Expert Rev Mol Med* 16: e15.  
<https://doi.org/10.1017/erm.2014.18>
119. Hesselink DA, Vaessen LM, Hop WC, Schoordijk W, Ijzermans JN, Baan CC, Weimar W (2005) The effects of renal transplantation on circulating dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 140: 384–393.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02755.x>
120. Vass DG, Hughes J, Marson LP (2009) Restorative and rejection-associated lymphangiogenesis after renal transplantation: friend or foe? *Transplantation* 88: 1237–1239.  
<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181c1afa7>
121. Weber E, Sozio F, Borghini A, Sestini P, Ronzoni E (2018) Pulmonary lymphatic vessel morphology: a review. *Ann Anat* 218: 110–117.  
<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.02.011>
122. Kulkarni RM, Herman A, Ikegami M, Greenberg JM, Akeson AL (2011) Lymphatic ontogeny and effect of hypoplasia in developing lung. *Mech Dev* 128: 29–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.mod.2010.09.003>
123. Solito R, Alessandrini C, Fruschelli M, Pucci AM, Gerli R (1997) An immunological correlation between the anchoring filaments of initial lymph vessels and the neighboring elastic fibers: a unified morphofunctional concept. *Lymphology* 30: 194–202. PMID: 9476251
124. Chambers DC, Cherikh WS, Harhay MO, Hayes D Jr, Hsich E, Khush KK, Meiser B, Potena L, Rossano JW, Toll AE, Singh TP, Sadavarte A, Zuckermann A, Stehlik J (2019) International So-

- ciety for Heart and Lung Transplantation. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult lung and heart-lung transplantation Report-2019; Focus theme: Donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant* 38:1042–1055.  
<https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.08.001>
125. *Whitson BA, Prekker ME, Herrington CS, Whelan TP, Radosevich DM, Hertz MI, Dahlberg PS* (2007) Primary graft dysfunction and long-term pulmonary function after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 26: 1004–1011.  
<https://doi.org/10.1016/j.healun.2007.07.018>
  126. *Carter YM, Davis RD* (2006) Primary graft dysfunction in lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med* 27: 501–507.  
<https://doi.org/10.1055/s-2006-954608>
  127. *Sato M* (2013) Chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation: the moving target. *Gen Thoracic Cardiovasc Surg* 61: 67–78.  
<https://doi.org/10.1007/s11748-012-0167-3>
  128. *Cui Y, Liu K, Lamattina AM, Visner G, El-Chemaly S* (2017) Lymphatic Vessels: The Next Frontier in Lung Transplant. *Ann Am Thorac Soc* 14: S226–S232.  
<https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201606-465MG>
  129. *Avlonitis VS, Wigfield CH, Kirby JA, Dark JH* (2005) The hemodynamic mechanisms of lung injury and systemic inflammatory response following brain death in the transplant donor. *Am J Transplant* 5: 684–693.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00755.x>
  130. *Watts RP, Thom O, Fraser JF* (2013) Inflammatory signalling associated with brain dead organ donation: from brain injury to brain stem death and posttransplant ischaemia reperfusion injury. *J Transplant* 2013: 521369.  
<https://doi.org/10.1155/2013/521369>
  131. *Khan SU, Salloum J, O'Donovan PB, Mascha EJ, Mehta AC, Matthay MA, Arroliga AC* (1999) Acute pulmonary edema after lung transplantation: the pulmonary reimplantation response. *Chest* 116: 187–194.  
<https://doi.org/10.1378/chest.116.1.187>
  132. *Shrestha S, Cho W, Stump B, Imani J, Lamattina AM, Louis PH, Pazzanese J, Rosas IO, Visner G, Perrella MA, El-Chemal S* (2020) FK506 induces lung lymphatic endothelial cell senescence and downregulates LYVE-1 expression, with associated decreased hyaluronan uptake. *Mol Med (Cambridge, Mass)* 26: 75.  
<https://doi.org/10.1186/s10020-020-00204-z>
  133. *Belmaati E, Jensen C, Kofoed KF, Iversen M, Steffensen I, Nielsen MB* (2009) Primary graft dysfunction: possible evaluation by high resolution computed tomography, and suggestions for a scoring system. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 9: 859–867.  
<https://doi.org/10.1510/icvts.2009.207852>
  134. *Outz Reed H, Wang L, Kahn ML, Hancock WW* (2020) Donor-host Lymphatic Anastomosis After Murine Lung Transplantation. *Transplantation* 104: 511–515.  
<https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003041>
  135. *Cui Y, Liu K, Monzon-Medina ME, Padera RF, Wang H, George G, Toprak D, Abdelnour E, D'Agostino E, Goldberg HJ, Perrella MA, Forteza RM, Rosas IO, Visner G, El-Chemaly S* (2015) Therapeutic lymphangiogenesis ameliorates established acute lung allograft rejection. *J Clin Invest* 125: 4255–4268.  
<https://doi.org/10.1172/JCI79693>
  136. *Gelman AE, Li W, Richardson SB, Zinselmeyer BH, Lai J, Okazaki M, Kornfeld CG, Kreisel FH, Sugimoto S, Tietjens JR, Dempster J, Patterson GA, Krupnick AS, Miller MJ, Kreisel D* (2009) Cutting edge: Acute lung allograft rejection is independent of secondary lymphoid organs. *J Immunol* 182: 3969–3973.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803514>
  137. *Constant SL, Brogdon JL, Piggott DA, Herrick CA, Visintin I, Ruddle NH, Bottomly K* (2002) Resident lung antigen-presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation in situ. *J Clin Invest* 110: 1441–1448.  
<https://doi.org/10.1172/JCI16109>
  138. *Todd JL, Wang X, Sugimoto S, Kennedy VE, Zhang HL, Pavlisko EN, Kelly FL, Huang H, Kreisel D, Palmer SM, Gelman AE* (2014) Hyaluronan contributes to bronchiolitis obliterans syndrome and stimulates lung allograft rejection through activation of innate immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 189: 556–566  
<https://doi.org/10.1164/rccm.201308-1481OC>
  139. *Reed HO, Wang L, Sonett J, Chen M, Yang J, Li L, Aradi P, Jakus Z, D'Armiento J, Hancock WW, Kahn ML* (2019) Lymphatic impairment leads to pulmonary tertiary lymphoid organ formation and alveolar damage. *J Clin Invest* 129: 2514–2526.  
<https://doi.org/10.1172/JCI125044>
  140. *Wagnetz D, Sato M, Hirayama S, Matsuda Y, Juvet SC, Yeung JC, Guan Z, Zhang L, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S* (2012) Rejection of tracheal allograft by intrapulmonary lymphoid

- neogenesis in the absence of secondary lymphoid organs. *Transplantation* 93: 1212–1220.  
<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318250fbf5>
141. Miyamoto E, Motoyama H, Sato M, Aoyama A, Menju T, Shikuma K, Sowa T, Yoshizawa A, Saito M, Takahagi A, Tanaka S, Takahashi M, Ohata K, Kondo T, Hijiya K, Chen-Yoshikawa TF, Date H (2017) Association of Local Intrapulmonary Production of Antibodies Specific to Donor Major Histocompatibility Complex Class I With the Progression of Chronic Rejection of Lung Allografts. *Transplantation* 101: e156–e165.  
<https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001665>
  142. Li W, Bribriescu AC, Nava RG, Brescia AA, Ibricevic A, Spahn JH, Brody SL, Ritter JH, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ, Kreisel D (2012) Lung transplant acceptance is facilitated by early events in the graft and is associated with lymphoid neogenesis. *Mucosal Immunol* 5: 544–554.  
<https://doi.org/10.1038/mi.2012.30>
  143. Koenig A, Thauinat O (2016) Lymphoid Neogenesis and Tertiary Lymphoid Organs in Transplanted Organs. *Front Immunol* 7: 646.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00646>
  144. Kellersmann R, Zhong R, Gao ZH, Garcia B, Zhang Z, Kiyochi H, Xing JJ, Grant D (1998) Beneficial effects of microsurgical lymphatic reconstruction after intestinal transplantation in rats. *Transplant Proc* 30: 2642.  
[https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(98\)00764-7](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(98)00764-7)

### **Lymphangiogenesis and Features of Lymphatic Drainage in Different Organs. Importance for the Allograft Future**

**M. N. Pankova<sup>a, \*</sup> and G. I. Lobov<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: pankova\_mn@infran.ru*

Lymphatic vessels are involved in a number of physiological and pathological processes and provide the uptake of fluid, immune cells, macromolecules, and lipids from the interstitial space. During solid organ transplant surgery, the lymphatic vessel continuum between graft and recipient is completely disrupted, and in despite of remarkable progress in the understanding of lymphatic biology, there is still unclear contribution of lymphatic restoration in effective function/ rejection of allografts. Lymphatic formation after transplantation is due to lymphangiogenesis, and the regeneration of a lymphatic drainage system provides a maintaining of interstitial fluid balance in the allograft and might reduce tissue edema. Newly formed lymphatic vessels provide transport of immune cells but well known a significant problem in organ transplantation is immune rejection and inflammation. On the one hand, lymphatic vessels facilitates the transport of antigen-presenting cells to the draining lymph nodes and entry of immune effector cells into the graft, accelerating the induction of alloimmunity and subsequent graft rejection. On the other hand, they provide exit route for lymphocytes and macrophages from graft reducing inflammation after transplantation. The degree of the participation of lymphangiogenesis in the development of acute and chronic rejection is significantly different in various organs, and knowledge of these mechanisms is needed to develop strategies of therapy providing success allograft survival. Data on the features of lymphangiogenesis, the structure of the lymphatic pathways and the role of lymphatic vessels for development of the acute and chronic rejection in the heart, kidneys and lungs are presented in this review.

**Keywords:** solid organ transplantation, rejection, lymphatic vessel, homeostasis, lymphangiogenesis

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

АНТАГОНИСТ ГРЕЛИНА [D-Lys3]-GHRP-6 СНИЖАЕТ ПРОЯВЛЕНИЯ  
ПОВЕДЕНИЯ РИСКА В МОДЕЛИ ИГРОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ  
У КРЫС, ИЗМЕНЯЯ ОБМЕН ДОФАМИНА И СЕРОТОНИНА

© 2021 г. А. А. Лебедев<sup>1</sup>, \*, И. В. Карпова<sup>1</sup>, Е. Р. Бычков<sup>1</sup>, Н. Д. Якушина<sup>1</sup>,  
И. Ю. Тиссен<sup>1</sup>, К. Е. Грамота<sup>1</sup>, Н. С. Ефимов<sup>1</sup>, П. Д. Шабанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: aalebedev-iem@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.01.2021 г.

После доработки 30.03.2021 г.

Принята к публикации 31.03.2021 г.

Исследовали действие антагониста рецепторов грелина [D-Lys3]-GHRP-6 на элементы игровой зависимости и обмен моноаминов в головном мозге крыс. У самцов крыс в течение 21-го дня вырабатывали пищевой рефлекс в трехлучевом лабиринте. В качестве вознаграждения использовали семена подсолнечника. В течение первых пяти дней в конце 1-го рукава животные получали 1 семя, в конце 2-го рукава – 2 семени и в конце 3-го рукава – 3 семени. Далее режим выдачи подкрепления изменяли: в 1-ом рукаве за каждый заход животные продолжали получать 1 семя, во 2-ом рукаве – по 2 семени, но за каждый 2-й заход, а в 3-ем рукаве – по 3 семени, но за каждый 3-й заход в данный рукав. Таким образом, при посещении первого рукава величина вознаграждения была минимальной, а вероятность его получения – максимальной. Посещение третьего рукава подкреплялось максимально, но с самой низкой долей вероятности. Крысам, выработавшим устойчивый навык побежек в лабиринте, интраназально вводили 0.9%-ный раствор NaCl или D-Lys3-GHRP-6 и исследовали поведение животных. Через 3 дня после тестирования поведения под действием препарата крысам повторно вводили 0.9%-ный NaCl или D-Lys3-GHRP-6. Через 80 мин крыс декапитировали, из головного мозга выделяли гипоталамус, гиппокамп, стриатум и обонятельный бугорок (компонент вентрального стриатума), где методом ВЭЖХ определяли содержание дофамина, серотонина и их метаболитов. Показано, что антагонист рецепторов грелина [D-Lys3]-GHRP-6 (20 мкл, 1 мг/мл, интраназально) повышал количество заходов в 1-й рукав лабиринта (с самой высокой вероятностью, но наименьшей величиной вознаграждения). Препарат не влиял на показатели обмена дофамина и серотонина в гипоталамусе. Под действием [D-Lys3]-GHRP-6 в левом гиппокампе достоверно повышалось содержание серотонина. Показатели обмена моноаминов в обонятельном бугорке и стриатуме изменялись только в правом полушарии, при этом в обеих структурах возрастало отношение содержания 5-гидроксииндолуксусной кислоты к содержанию серотонина. В правом стриатуме данные изменения также сопровождались повышением содержания метаболитов серотонина и дофамина. Таким образом, в основе способности препарата [D-Lys3]-GHRP-6 изменять стратегию выбора в пользу наибольшей вероятности, но наименьшей величины подкрепления лежит возрастание активности дофаминергической и серотонинергической систем в дорсальном и вентральном стриатуме правого полушария головного мозга и содержания серотонина – в гиппокампе левого полушария.

*Ключевые слова:* грелин, [D-Lys3]-GHRP-6, игровая зависимость, дофамин, серотонин

DOI: 10.31857/S0869813921090065

Игровая зависимость как объект для изучения представляет особый интерес. В международных классификаторах современных редакций (ICD 10 и DSM-5) она выделяется в виде отдельного заболевания, является одной из нехимических форм зависимости и имеет все присущие традиционному пониманию этого термина характеристики: развитие толерантности (привыкание), развитие собственно зависимости и соответствующего ей синдрома отмены [1]. Несмотря на общее признание игромании как самостоятельного заболевания, не существует единых или общепринятых подходов к терапии данного состояния, как нет и ни одного зарегистрированного по данному показанию лекарственного средства. Существует однако опыт использования различных психотерапевтических подходов [2]. Современная терапия использует препараты различных классов: антидепрессанты, антагонисты опиоидных рецепторов, нормотимики, NMDA-антагонисты и антипсихотики [3].

Методы скрининговой диагностики игромании сосредоточены на использовании опросников, а наиболее объективным способом оценки степени проявления азартности субъекта в лабораторных условиях является метод IOWA gambling task, основанный на помещении субъекта в ситуацию непредсказуемого или частично предсказуемого выбора с разнореальной подкреплением и последующей оценке способности испытуемого рационально действовать в условиях непредсказуемого выбора для максимизации собственной выгоды. В последние годы IOWA gambling task стал применяться в опытах на животных [4]. В нашей лаборатории был разработан вариант модели данного теста в трехлучевом лабиринте у крыс [5].

Стимулом для проведения настоящего исследования послужили данные об участии нейропептидов и моноаминов в механизмах игровой зависимости [4, 6]. В формировании игровой зависимости участвует ряд нейропептидов: CRF, орексин, грелин и опиоиды [7, 8]. Изменения в регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы также непосредственно связаны с появлением поведения риска и азарта при формировании игровой зависимости. В частности, игровая зависимость связана с высоким уровнем кортизола и адреналина [9].

Особый интерес могут представлять нейропептиды, для которых было показано участие в процессах формирования других форм зависимостей и в механизмах подкрепления. К таким нейропептидам, в частности, относится грелин. Он вырабатывается в желудке и гипоталамусе, состоит из 28 аминокислот, его рецептором служит GHSR1A [10, 11]. Грелин участвует в механизмах подкрепления и в формировании зависимости от психоактивных средств на фоне стрессорных факторов и обстановочных раздражителей [12, 13]. Показано наличие рецепторов грелина в структурах мозга с высоким содержанием моноаминов и участвующих в развитии игровой зависимости: вентральной области покрышки, вентромедиальном ядре гипоталамуса, гиппокампе [14]. Кроме того, грелиновый рецептор проявляет способность к димеризации с рецепторами дофамина, серотонина и меланокортина [15]. Таким образом, в основе механизмов участия грелина в этих процессах может лежать его взаимодействие с моноаминергическими системами головного мозга. Поскольку у лабораторных грызунов обнаружена асимметрия содержания моноаминов [16], мы предположили, что характер данного взаимодействия в симметричных зонах левого и правого полушария может быть различным.

Целью работы было изучение проявления поведения риска в модели игровой зависимости на фоне действия антагониста грелина [D-Lys3]-GHRP-6, также его влияние на содержание дофамина, серотонина и их метаболитов в симметричных отделах головного мозга у крыс.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе было использовано 26 крыс-самцов линии Вистар, полученных из питомника лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область). Живот-

ных содержали в условиях вивария в стандартных клетках при свободном доступе к воде и пище в условиях инвертированного света 8.00–20.00 при температуре  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Все опыты проведены в соответствии с Женевской конвенцией International guiding principles for biomedical research involving animals (Geneva, 1990), Хельсинской декларацией 2000 г. и протоколом GLP о гуманном отношении к животным (Директива Европейского сообщества № 2010/63/ЕС).

Установка для тестирования элементов игровой зависимости состояла из стартовой площадки ( $35 \times 50 \times 35$  см) и трех рукавов по  $50 \times 15 \times 35$  см. В конце каждого рукава установки находилась кормушка. В качестве вознаграждения служили семена подсолнечника. Крысу помещали на стартовую площадку, затем она совершала побег по рукаву лабиринта и достигала пищевого подкрепления. Когда крыса возвращалась обратно на стартовую площадку, в кормушку, расположенную в конце посещенного рукава, автоматически подавалась новая порция пищевого подкрепления. Определяли число заходов в рукава и выходы из них в течение 10 мин. В дни эксперимента животных кормили только после окончания опыта, длящегося в течение 4-х ч, поэтому к следующему опыту животных 20 ч выдерживали без пищи. Обучение длилось в течение 21-го дня. В первые 5 дней тестирования заход в первый рукав лабиринта подкреплялся 1 семенем подсолнечника, заход во второй рукав – 2 семенами и заход в третий рукав – 3 семенами. На 6-й день животных переводили на стандартный режим кормления, и обучение в лабиринте не производили. На 7-й день обучение также не производили, но возобновляли 20-ти часовую пищевую депривацию. Начиная с 8-го дня, в течение двух недель в кормушку 1-го рукава подавали 1 семя при каждой побежке в данный рукав, в кормушку 2-го рукава подавали 2 семени после каждого второго посещения данного рукава, в кормушку 3-го рукава – 3 семени после каждого третьего его посещения. Крыс, которые не обучались в течение первых 5-ти дней (не производили побегов в лабиринте, 15% животных), в дальнейшем в эксперименты не включали [5].

В качестве антагониста рецепторов грелина использовали D-Lys3-GHRP-6 (Tocris, Великобритания). Препарат в концентрации 1 мг/мл вводили интраназально в объеме 20 мкл (10 мкл в каждую ноздрю), таким образом, разовая доза препарата на животное составляла 20 мкг. Контрольные крысы получали эквивалентный объем 0.9%-ного раствора NaCl. На протяжении исследования препарат животным вводили дважды: в первый раз – за 20 мин до исследования поведения, во второй – через три дня после тестирования поведения, за 80 мин до декапитации крыс.

Определение содержания дофамина, серотонина и их метаболитов в структурах мозга проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД). Известно, что продолжительность действия фармакологических препаратов пептидной природы обычно ограничивается 48-ю часами, поэтому исследование действия пептидного антагониста грелина [D-Lys3]-GHRP-6 на обмен моноаминов проводили через 3 дня после тестирования его влияния на поведение. Крыс декапитировали через 80 мин после интраназального введения [D-Lys3]-GHRP-6. С вентральной поверхности мозга отщипывали обонятельный бугорок (элемент вентрального стриатума). Дорсальный стриатум (в дальнейшем – стриатум), гипоталамус и дорзальный гиппокамп (в дальнейшем – гиппокамп) выделяли из коронарных срезов мозга в соответствии с атласом мозга крысы [17]. Ткани соответствующих структур левой и правой сторон мозга помещали в отдельные пробирки и хранили до хроматографического анализа при температуре  $-80^\circ\text{C}$ . Образцы мозга гомогенизировали в 0.1 N растворе HCl и центрифугировали при 14000 g в течение 15 мин. Содержание дофамина (ДА), диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), гомованилиновой кислоты (ГВК), серотонина (5-ГТ) и гидроксиндолюксусной кислоты (5-ГИУК) определяли на хроматографической системе BeckmanCoulter с амперометрическим детектором LC-4CBAS [18].

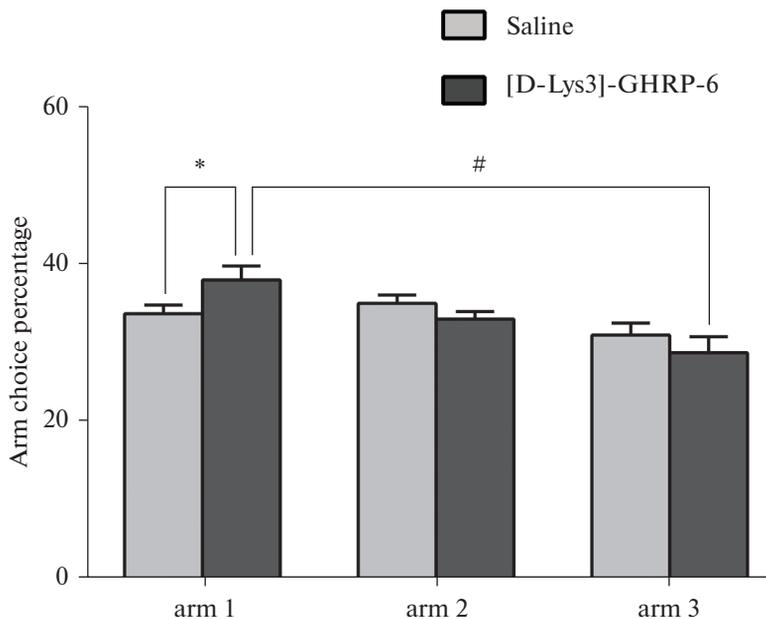
На аналитическую колонку Phenomenex ( $4.6 \times 250.0$  мм) с сорбентом SphereClone-ODS2 наносили 20 мкл супернатанта образца мозга. Определение содержания моноаминов и их метаболитов проводили при потенциале  $+0.70$  В. Подвижная фаза содержала 5.5 мМ цитрат-фосфатного буфера, 0.7 мМ октансульфоновой кислоты, 0.5 мМ EDTA и 8% ацетонитрила (рН 3.0). Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга выражали в нг на мг ткани.

Полученные данные анализировали с использованием пакета статистических программ GraphPad PRISM 6.0 (GraphPad Software, США). Результаты исследования поведения животных обрабатывали методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, используя критерий попарных сравнений групп Стьюдента–Ньюмена–Кейлса и Данна. Межполушарные различия в показателях обмена моноаминов в структурах мозга оценивали с помощью парного критерия Вилкоксона, а различия в соответствующих показателях между контрольной и экспериментальной группами животных – с помощью непарного критерия Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В течение первых 5–6 дней обучения у крыс часто наблюдали локомоторную активность и исследовательские реакции в пределах стартовой площадки установки для тестирования игровой зависимости. На второй неделе обучения пищевой рефлекс стал полностью доминировать в поведении: животные производили заходы в рукава с кормушками и достигали пищи. К концу третьей недели тестирования крысы демонстрировали до 50 побегов к кормушкам за эксперимент. При этом количество побегов к кормушкам каждого из рукавов лабиринта был на одном уровне. Повторение тестирования в течение четырех дней показало, что процентное соотношение числа побегов к кормушкам 1-го, 2-го и 3-го рукавов сохранялось на одном уровне, т.е. в целом по обученной группе крыс не наблюдалось преобладания какого-либо из рукавов лабиринта (рис. 1). Последнее обстоятельство является важным для стабилизации полученного навыка по группе животных в условиях применения IOWA теста. При тестировании действия антагониста грелиновых рецепторов [D-Lys3]-GHRP-6 у животных достоверно ( $p \leq 0.05$ ) изменялось соотношение побегов к кормушкам 1-го, 2-го и 3-го рукавов по сравнению с контролем (0.9%-ный раствор NaCl). После введения [D-Lys3]-GHRP-6 процент числа заходов в первый рукав (к кормушке 1) повышался достоверно ( $p \leq 0.05$ ) по сравнению с контролем (0.9%-ный раствор NaCl) и по сравнению с заходами в третий рукав (к кормушке 3) ( $p \leq 0.05$ ) (рис. 1).

Введение антагониста рецепторов грелина [D-Lys3]-GHRP-6 у крыс сопровождалось унилатеральными изменениями метаболизма моноаминов в гиппокампе, обонятельном бугорке и стриатуме. После введения препарата содержание 5-ГТ в левом гиппокампе достоверно повышалось на 53.4% ( $p \leq 0.05$ , табл. 1) по сравнению с введением физиологического раствора (контроль). При этом соотношение 5-ГИУК/5-ГТ в данной структуре мозга снижалось на 29.8% ( $p \leq 0.05$ ). В правом обонятельном бугорке данное соотношение, напротив, достоверно повышалось на 25.7% ( $p \leq 0.05$ , табл. 1). В правом стриатуме после введения [D-Lys3]-GHRP-6 было зарегистрировано повышение содержания 5-ГИУК на 37.5% ( $p \leq 0.05$ ). Кроме изменения уровня метаболита 5-ГТ, в правом стриатуме после введения препарата увеличивалось содержание метаболитов ДА: уровень ДОФУК по сравнению с введением физиологического раствора возрастал на 38.9% ( $p \leq 0.05$ , табл. 2), а ГВК – в 2.2 раза ( $p \leq 0.05$ , табл. 3). В гипоталамусе достоверных изменений показателей обмена моноаминов после введения [D-Lys3]-GHRP-6 отмечено не было (табл. 1–3).



**Рис. 1.** Влияние интраназального введения [D-Lys3]-GHRP-6 на поведение животных в трехлучевом лабиринте в ситуации выбора вероятности и величины пищевого подкрепления.

\* –  $p \leq 0.05$  по сравнению с группой животных, получавших физиологический раствор; # –  $p \leq 0.05$  внутрigrупповое сравнение заходов в различные рукава трехлучевого лабиринта у животных, получавших [D-Lys3]-GHRP-6.

**Таблица 1.** Уровень серотонина, его метаболита (нг/мг ткани) и значение показателя обмена серотонина в структурах головного мозга крыс после введения антагониста рецепторов грелина [D-Lys3]-GHRP-6

Группа крыс	5-ГТ		5-ГИУК		5-ГИУК/5-ГТ	
	левое полушарие	правое полушарие	левое полушарие	правое полушарие	левое полушарие	правое полушарие
Гиппокамп						
Контроль (0.9%-ный NaCl)	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.02	1.48 ± 0.08	1.46 ± 0.02
[D-Lys3]-GHRP-6	0.30 ± 0.03*	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.01	0.33 ± 0.03	1.04 ± 0.08*	1.34 ± 0.11
Обонятельный бугорок						
Контроль (0.9%-ный NaCl)	0.47 ± 0.03	0.51 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.71 ± 0.04	0.68 ± 0.03
[D-Lys3]-GHRP-6	0.45 ± 0.04	0.43 ± 0.05	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.80 ± 0.04	0.86 ± 0.05*
Стриатум						
Контроль (0.9%-ный NaCl)	0.29 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.25 ± 0.03	1.15 ± 0.14	1.19 ± 0.15
[D-Lys3]-GHRP-6	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03*	1.37 ± 0.19	1.17 ± 0.04
Гипоталамус						
Контроль (0.9%-ный NaCl)	0.43 ± 0.036	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.91 ± 0.05	0.96 ± 0.08
[D-Lys3]-GHRP-6	0.47 ± 0.04	0.44 ± 0.02	0.45 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.98 ± 0.10	1.11 ± 0.11

\*  $p < 0.05$  – относительно контрольной группы крыс. Количество животных в контрольной группе (получавших 0.9%-ный раствор NaCl) – 6, в опытной группе (получавших [D-Lys3]-GHRP-6) – 7. Указано среднее ± ошибка среднего.

**Таблица 2.** Уровень дофамина, диоксифенилуксусной кислоты (нг/мг ткани) и значение соотношения ДОФУК/ДА в структурах головного мозга крыс после введения антагониста рецепторов грелина [D-Lys3]-GHRP-6

Группа животных	ДА		ДОФУК		ДОФУК/ДА	
	левое полушарие	правое полушарие	левое полушарие	правое полушарие	левое полушарие	правое полушарие
Обонятельный бугорок						
Контроль (0.9%-ный NaCl)	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.61 ± 0.06	0.63 ± 0.07
[D-Lys3]-GHRP-6	0.30 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.74 ± 0.07
Стриатум						
Контроль (0.9%-ный NaCl)	0.54 ± 0.05	0.42 ± 0.04	0.37 ± 0.05	0.27 ± 0.02	0.67 ± 0.04	0.65 ± 0.07
[D-Lys3]-GHRP-6	0.50 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.37 ± 0.03*	0.76 ± 0.06	0.73 ± 0.03
Гипоталамус						
Контроль (0.9%-ный NaCl)	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.60 ± 0.15	0.91 ± 0.10
[D-Lys3]-GHRP-6	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.82 ± 0.19	1.11 ± 0.24

\*  $p < 0.05$  – относительно контрольной группы крыс. Количество животных в контрольной группе (получавших 0.9%-ный раствор NaCl) – 6, в опытной группе (получавших [D-Lys3]-GHRP-6) – 7. Указано среднее ± ошибка среднего.

**Таблица 3.** Уровень метаболита дофамина – гомованилиновой кислоты – и значение соотношения ГВК/ДА в стриатуме и гипоталамусе крыс после введения антагониста рецепторов грелина [D-Lys3]-GHRP-6

Группа животных	ГВК (нг/мг ткани)		ГВК/ДА	
	левое полушарие	правое полушарие	левое полушарие	правое полушарие
Обонятельный бугорок				
Контроль (0.9%-ный NaCl)	0.14 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.44 ± 0.07	0.39 ± 0.05
[D-Lys3]-GHRP-6	0.10 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.39 ± 0.13	0.43 ± 0.08
Стриатум				
Контроль (0.9%-ный NaCl)	0.21 ± 0.05	0.09 ± 0.04	0.36 ± 0.07	0.22 ± 0.10
[D-Lys3]-GHRP-6	0.26 ± 0.03	0.21 ± 0.02*	0.54 ± 0.07	0.41 ± 0.02
Гипоталамус				
Контроль (0.9%-ный NaCl)	0.19 ± 0.07	0.11 ± 0.05	2.98 ± 1.18	2.16 ± 0.69
[D-Lys3]-GHRP-6	0.24 ± 0.05	0.22 ± 0.06	2.72 ± 0.43	3.55 ± 1.59

\*  $p < 0.05$  – относительно контрольной группы крыс. Количество животных в контрольной группе (получавших 0.9%-ный раствор NaCl) – 6, в опытной группе (получавших [D-Lys3]-GHRP-6) – 7. Указано среднее ± ошибка среднего.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как было показано в настоящих экспериментах, антагонист грелиновых рецепторов [D-Lys3]-GHRP-6 повышал число побегов в первый рукав лабиринта, что говорит о проявлении у животных менее рискованного поведения, наблюдающегося в ситуации выбора разнoverоятного подкрепления. Ранее нами были показаны разнонаправленные эффекты грелина и [D-Lys3]-GHRP-6 в трехлучевом лабиринте. Введение грелина повышало соотношение побегов в сторону третьего рукава лабиринта с низкой вероятностью, но большей величиной вознаграждения [8]. Таким образом, настоящими исследованиями мы подтвердили включение грелиновой системы в механизмы разнoverоятного подкрепления и применили эти группы животных для дальнейшего анализа обмена медиаторов в головном мозге после введения антагониста грелина [D-Lys3]-GHRP-6.

В настоящем исследовании с помощью ВЭЖХ/ЭД были получены достоверные различия показателей обмена ДА и 5-ГТ в структурах переднего мозга после введения антагониста грелина [D-Lys3]-GHRP-6 у крыс (табл. 1–3). При введении [D-Lys3]-GHRP-6 содержание 5-ГТ достоверно повышалось в гиппокампе левого полушария, при этом уровень 5-ГИУК (метаболита 5-ГТ) не изменялся, в результате чего соотношение 5-ГТ/5-ГИУК уменьшалось. Таким образом, обнаруженное нами повышение уровня 5-ГТ в гиппокампе не обязательно свидетельствует о возрастании синаптического выброса данного медиатора, а, напротив, может быть следствием накопления медиатора в терминалях. Остальные изменения касались только правого полушария. В частности, отношение 5-ГИУК/5-ГТ в обонятельном бугорке достоверно повышалось в правом полушарии, что свидетельствует либо о повышенном выбросе 5-ГТ, либо об активации серотонинового транспортера в данной структуре мозга. В стриатуме правого полушария повышалось не только содержание 5-ГИУК – метаболита серотонина, но и уровень метаболитов ДА (ГБК и ДОФУК). Поскольку фермент образования ГБК – катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ) – локализован экстраклеточно, повышение уровня данного метаболита свидетельствует об усилении синаптического выброса ДА. В свою очередь, возрастание уровня ДОФУК и 5-ГИУК позволяют предположить, что под влиянием препарата в правом стриатуме может повышаться активность моноаминовых транспортеров. Таким образом, у крыс, согласно нашим данным, выбор менее рискованной программы поведения, происходящий под действием препарата [D-Lys3]-GHRP-6, ассоциируется со снижением активности серотонинергической системы в гиппокампе левого полушария мозга и ее возрастании в структурах дорсального (собственно стриатум) и вентрального (обонятельный бугорок) стриатума правого полушария мозга, которое в правом стриатуме сопровождается усилением дофаминергической передачи.

Полученные данные во многом согласуются с данными литературы, хотя прямых соответствий не отмечается. Ранее было показано, что появление исследовательского и рискованного поведения в IOWA тесте у мышей C57Bl/6J связано с высоким уровнем ДА, 5-ГТ и норадреналина в гиппокампе [19]. Согласно данной литературе, у животных, склонных к рискованному поведению, в гиппокампе также происходит активация рецепторов глутамата [20]. Предполагается, что изменение активности основных медиаторных систем головного мозга в гиппокампе происходит в результате взаимодействия внутриклеточных сигнальных систем. Показано, что грелин стимулирует фосфорилирование NR1 субъединицы NMDA-рецепторов через протеинкиназа-А-зависимые механизмы [20]. В настоящей работе интраназальное введение антагониста рецепторов грелина вызывало изменение активности серотонинергической системы в гиппокампе левого полушария, что, возможно, приводило к снижению глутаматергической нейротрансмиссии в данной

структуре мозга. На поведенческом уровне это проявлялось выбором подкрепления с меньшей силой, но с большей вероятностью его получения. Ранее было показано, что гиппокампэктомизированные крысы проявляют ответы только на пищевое подкрепление с высокой вероятностью [21]. При этом у них полностью сохраняется способность к формированию новых временных связей. В то же время известно, что после удаления гиппокампа у животных дифференцировка при образовании условных рефлексов вырабатывается даже быстрее, чем у контрольных крыс. Таким образом, гиппокамп отвечает на подрепляющие агенты среды, которые могут реализоваться с малой вероятностью [21]. Антагонист рецепторов грелина, по-видимому, снижает активацию гиппокампа на сигналы маловероятных событий, что и является перспективой для коррекции игровой зависимости.

Однонаправленные повышения содержания метаболитов ДА и 5-ГТ, а также увеличение соотношения метаболит/медиатор в структурах вентрального и дорсального стриатума правого полушария после введения [D-Lys3]-GHRP-6 говорит о повышении активности указанных нейрохимических систем правого полушария, что также может служить одним из внутримозговых механизмов коррекции поведения при игровой зависимости. Таким образом, в основе выбора более высоковероятного, но, в то же время, меньшего подкрепления на фоне [D-Lys3]-GHRP-6 лежит правосторонняя активация мезолимбической и нигростриатной дофаминергических систем на фоне усиления выброса 5-ГТ в стриатуме правого полушария. Исходное снижение активности указанных нейрохимических систем у лиц с игровой зависимостью было отмечено ранее в ряде исследований. Показано, что дофаминергическая и серотонинергическая системы, которые, как известно, способствуют функциональной связи между лимбической и корковой областями, являются важными кандидатами для модуляции принятия решений.

Важно отметить, что несмотря на то, что рецепторы грелина активно экспрессируются в гипоталамусе [14], [D-Lys3]-GHRP-6 достоверно не влиял на показатели обмена ДА и 5-ГТ в данной структуре мозга. Таким образом, изменение стратегии поведения, происходящее под действием препарата, в большей степени ассоциируется со способностью препарата влиять на обмен моноаминов в структурах переднего мозга.

Сдвиги в функционировании указанных нейрохимических систем лежат в основе патологической зависимости от азартных игр, психического расстройства, связанного с чрезмерным рискованным поведением и неадекватным принятием решений [22]. У человека было выделено несколько полиморфизмов в генах ферментов метаболизма 5-ГТ и ДА, которые влияют на функцию лобной коры и лимбической системы, определяющих личностные черты (например, невротизм, избегание опасности, настойчивость и стремление к новизне), которые играют центральную роль в принятии решений [23]. С результатами наших экспериментов согласуются данные, полученные на человеке, свидетельствующие о том, что существует обратная зависимость между уровнем 5-ГТ и импульсивностью, которая может влиять на принятие решений. Например, лица, употребляющие серотонинергический нейротоксический препарат МДМА, демонстрируют повышенную импульсивность [24]. Некоторые варианты генов, связанных с функционированием серотонинергической системы, ассоциируются с дефицитом в принятии решений во время азартных игр. В частности, пациенты с депрессией, которые совершали ошибки и демонстрировали повышенный выбор неблагоприятных вариантов в игре, оказались носителями особой формы гена серотонинового транспортера (5-HTTLPRs) [25]. Одно из предположений заключается в том, что люди, несущие аллель 5-HTTLPRs, обладают повышенной бдительностью, что является преимуществом, когда стимулы окружающей среды можно контролировать и управлять ими. Действительно, в задаче принятия рискованного решения с явным указанием

вероятности выбора испытуемые выбирали более выгодные решения из-за повышенного риска неблагоприятных исходов. Напротив, в условиях неопределенности стимулов, например, во время игрового теста, носители аллеля 5-HTTLPRs проявляли дезадаптивное поведение [26]. В целом, эти данные указывают на то, что серотонинергическая синаптическая передача может отрицательно влиять на принятие решений в игровых тестах. Обнаруженная нами способность препарата [D-Lys3]-GHRP-6, снижающего проявления рискованного поведения, активировать серотонинергическую систему согласуется с данными представлениями.

В исследованиях на человеке было показано, что изменения в дофаминергической системе также влияют на выбор более выгодных решений в игровом тесте. Снижение эффективности выбора наблюдалось у больных с патологией, связанной с дисфункцией ДА, в частности, при шизофрении, болезни Паркинсона, наркомании и игромании [27]. По данным позитронно-эмиссионной томографии, у здоровых мужчин высвобождение ДА в вентральном стриатуме положительно коррелирует с показателями игровой активности, а у патологических игроков — отрицательно [28]. Тем не менее, в нашем исследовании на крысах не было обнаружено влияния антагониста грелина [D-Lys3]-GHRP-6 на показатели обмена ДА в обязательном бугорке, который является частью вентрального стриатума. Вместе с тем, в дорсальном стриатуме препарат вызывал существенное возрастание содержания метаболитов ДА, что свидетельствует о повышении выброса и обратного захвата данного медиатора в структуре мозга, которая в большей степени ассоциируется с организацией двигательных программ, чем с регуляцией эмоционального состояния. Примечательно, что указанный эффект был отмечен только в правом стриатуме. Таким образом, можно предположить, что активация дофаминергической системы правого стриатума у крыс ассоциируется с выбором программы поведения, направленной на регулярное получение подкрепления, а не на достижение максимального, но маловероятного вознаграждения. Известно, что ДА участвует в ассоциативном обучении, восприятии времени и передаче сигналов в системе вознаграждения, которые являются фундаментальными процессами, необходимыми для принятия решений. Снижение уровня ДА ухудшает процесс принятия решений у здоровых людей. Это может быть связано со снижением восприятия вероятности и времени [29]. В задаче по принятию решения о риске, в которой испытуемые были разделены на группы на основе того выбора из предложенных вариантов, который они совершали, носители аллеля DRD4 были более склонны к риску по сравнению с людьми с отсутствием данного аллеля. Последнее говорит о том, что аллель DRD4 связан с новизной. Что касается полиморфизма в гене DRD4, здоровые мужчины-носители аллеля этого гена выбирают значительно больше карт из неблагоприятных колод [29]. В совокупности, эти данные говорят о том, что ДА, возможно, во взаимодействии с 5-ГТ, может модулировать принятие решений при игровых тестах.

## ВЫВОДЫ

1. Выбор наименьшей степени риска при снижении величины подкрепления на фоне введения [D-Lys3]-GHRP-6 сопровождается однонаправленным повышением содержания метаболитов дофамина и серотонина, а также увеличением соотношения метаболит/медиатор в вентральном и дорсальном стриатуме правого полушария, что говорит о повышении активности указанных нейрохимических систем правого полушария и может являться одним из внутримозговых механизмов коррекции игровой зависимости.

2. Выбор наименьшей степени риска при снижении величины подкрепления на фоне введения [D-Lys3]-GHRP-6 ассоциируется с повышением содержания серо-

тонина в гиппокампе левого полушария. Антагонист рецепторов грелина, по-видимому, снижает активацию гиппокампа на сигналы маловероятных событий за счет воздействия на серотонинергическую передачу в данной структуре мозга левого полушария, что делает препарат перспективным для коррекции игровой зависимости.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

А.А.Л. – планирование эксперимента, написание и редактирование статьи; И.В.К. – подготовка проб мозга, анализ содержания моноаминов и их метаболитов методом ВЭЖХ/ЭД, написание и редактирование статьи; Е.Р.Б. – планирование эксперимента, статистическая обработка данных; Н.Д.Я. – обучение и отбор экспериментальных животных, тестирование действия препарата, И.Ю.Т. – тестирование действия препарата, подготовка проб мозга для анализа ВЭЖХ/ЭД, К.Е.Г. – обучение экспериментальных животных, Н.С.Е. – обучение экспериментальных животных; П.Д.Ш. – написание и редактирование статьи.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blaszczynski A, Collins P, Fong D, Ladouceur R, Nower L, Shaffer HJ, Tavares H, Venisse JL* (2011) Responsible gambling: general principles and minimal requirements. *J Gambl Stud* 27(4): 565–573. <https://doi.org/10.1007/s10899-010-9214-0>
2. *Petry NM* (2003) Patterns and correlates of Gamblers Anonymous attendance in pathological gamblers seeking professional treatment. *Addict Behav* 28: 1049–1062. [https://doi.org/10.1016/s0306-4603\(02\)00233-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4603(02)00233-2)
3. *Grant JE, Odlaug BL, Schreiber LRN* (2014). Pharmacological treatments in pathological gambling. *Br J Clin Pharmacol* 77(2): 375–381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04457.x>
4. *Zeeb FD, Robbins TW, Winstanley CA* (2009) Serotonergic and dopaminergic modulation of gambling behavior as assessed using a novel rat gambling task. *Neuropsychopharmacology* 34(10): 2329–2343. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.62>
5. *Лебедев АА, Якушина НД, Грамота КЕ, Тиссен ИЮ, Бычков ЕР, Шабанов ПД* (2018) Моделирование игровой зависимости у крыс в ситуации выбора силы и вероятности пищевого подкрепления в лабиринте. *Наркология* 17(5): 31–35 [*Lebedev AA, Yakushina ND, Diploma KE, Thyssen I Yu, Bychkov ER, Shabanov PD* (2018) Modeling of gambling in rats in the situation of choosing the strength and the probability of food reinforcement in the maze. *Narcology* 17(5): 31–35 (In Russ)]. <https://doi.org/10.25557/1682-8313.2018.05.31-35>
6. *Шабанов ПД, Якушина НД, Лебедев АА* (2020) Фармакология пептидных механизмов игрового поведения у крыс. *Вопр наркол* 187(4): 24–44 [*Shabanov PD, Yakushina ND, Lebedev AA* (2020) Pharmacology of peptide mechanisms of play behavior in rats. *Vopr Narkol* 187(4): 24–44 (In Russ)]. [https://doi.org/10.47877/0234-0623\\_2020\\_4\\_24](https://doi.org/10.47877/0234-0623_2020_4_24)
7. *Lebedev AA, Bessolova YuN, Efimov NS, Bychkov ER, Droblenkov AV, Shabanov PD* (2020) Role of orexin peptide system in emotional overeating induced by brain reward stimulation in fed rats. *Res Results Pharmacol* 6(1): 81–91. <https://doi.org/10.3897/grpharmacology6.52180>
8. *Лебедев АА, Хохлов ПП, Якушина НД, Грамота КЕ, Тиссен ИЮ, Бычков ЕР, Айрапетов МИ, Шабанов ПД* (2019) Фармакологический и биохимический анализ участия пептидной системы грелина в поведенческих проявлениях игровой зависимости у крыс. *Экспер клин фармакол* 82(6): 16–20. [*Lebedev AA, Khokhlov PP, Yakushina ND, Gramota KE, Thyssen IYu, Bychkov ER, Airapetov MI, Shabanov PD* (2019) Pharmacological and biochemical

- analysis of the involvement of the ghrelin peptide system in behavioral manifestations of gambling in rats. *Exper Clin Pharmacol* 82(6): 16–20 (In Russ)].
9. *Wallin-Miller K, Li G, Kelishani D, Wood RI* (2018) Anabolic-androgenic steroids alter decision making in a balanced rodent model of the Iowa gambling task. *Neuroscience* 132(3): 152–160. <https://doi.org/10.1037/bne0000243>
  10. *Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K* (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762): 656–660. <https://doi.org/10.1038/45230>
  11. *Yin Y* (2014) The growth hormone secretagogue receptor: Its intracellular signaling and regulation *Int J Mol Sci* 15(3): 4837–4855. <https://doi.org/10.3390/ijms15034837>
  12. *Шабанов ПД, Лебедев АА, Бычков ЕР, Лавров НВ, Морозов ВИ* (2020) Нейрохимические механизмы и фармакология грелинов. *Обзоры по клин фармакол и лекарств терапии* 18(1): 5–22. [Shabanov PD., Lebedev AA, Bychkov ER, Lavrov NV, Morozov VI (2020) Neurochemical mechanisms and pharmacology of ghrelin. *Rev Clin Pharmacol Drug Therapy* 18(1): 5–22 (In Russ)]. <https://doi.org/10.17816/RCF1815-22>
  13. *Gomez JL, Cunningham CL, Finn DA* (2015) Differential effects of ghrelin antagonists on alcohol drinking and reinforcement in mouse and rat models of alcohol dependence. *Neuropharmacology* 97(10): 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.026>
  14. *Andrews ZB* (2011) The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends Neurosci* 34(1): 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.10.00121035199>
  15. *Kern A, Albarran-Zeckler R, Walsh HE, Smith RG* (2012) Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron* 73(2): 317–332. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.038>
  16. *Rosen GD, Finklestein S, Stoll AL, Yutzey DA, Denenberg VH* (1984) Neurochemical asymmetries in the albino rat's cortex, striatum, and nucleus accumbens. *Life Sci* 34(12): 1143–1148. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(84\)90085-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(84)90085-7)
  17. *Paxinos G, Watson C* (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*: 6th Ed. San Diego Acad Press.
  18. *Krasnova IN, Bychkov ER, Lioudyno VI, Zubareva OE, Dambinova SA* (2000). Intracerebroventricular administration of substance P increases dopamine content in the brain of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience* 95(1): 113–117. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00400-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00400-5)
  19. *Pittaras E, Callebert J, Chennaoui M, Rabat A, Granon S* (2016) Individual behavioral and neurochemical markers of unadapted decision-making processes in healthy inbred mice. *Brain Struct Funct* 221(9): 4615–4629. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1192-2>
  20. *de Laat B, Weerasekera A, Leurquin-Sterk G et al.* (2018) Glutamatergic biomarkers for cocaine addiction: a longitudinal study using MR spectroscopy and mGluR5 PET in self-administering rats. *Nucl Med* 59(6): 952–959. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.202614>
  21. *Симонов ПВ* (ред) (1981) Эмоциональный мозг. М. Наука [Simonov PV (ed) (1981) *Emotional'nyu mozg [The emotional brain]* M. Nauka (In Russ)].
  22. *Marazziti D, Golia F, Picchetti M, Pioli E, Mannari P, Lenzi F, Conversano C, Carmassi C, Catena Dell'osso M, Consoli G, Baroni S, Giannaccini G, Zanda G, Dell'osso L* (2008) Decreased density of the plate let serotonin transporter in pathological gamblers. *Neuropsychobiology* 57(1–2): 38–43. <https://doi.org/10.1159/000129665>
  23. *Paloyelis Y, Asherson P, Mehta MA, Faraone SV, Kuntsi J* (2010) DAT1 and COMT effects on delay discounting and trait impulsivity in male adolescents with attention deficit/hyperactivity disorder and healthy controls. *Neuropsychopharmacology* 35(12): 2414–2426. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.124>
  24. *Hanson KL, Luciana M, Sullwold K* (2008) Reward-related decision-making deficits and elevated impulsivity among MDMA and other drug users. *Drug Alcohol Depend* 96(1–2): 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2008.02.003>
  25. *Stoltenberg SF, Vandever JM* (2010) Gender moderates the association between 5-HTTLPR and decision-making under ambiguity but not under risk. *Neuropharmacology* 58(2): 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.09.010>
  26. *Homberg JR, Lesch KP* (2010) Looking on the bright side of serotonin transporter gene variation. *Biol Psychiatry* 69(6): 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.09.024>

27. *Mimura M, Oeda R, Kawamura M* (2006) Impaired decision-making in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 12(3): 169–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2005.12.003>
28. *Linnert J, Moller A, Peterson E, Gjedde A, Doudet D* (2011) Dopamine release in ventral striatum during Iowa gambling task performance is associated with increased excitement levels in pathological gambling. *Addiction* 106(2): 383–390.  
<https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.03126.x>
29. *van den Bos R, Homberg J, Gijbbers E, Den Heijer E, Cuppen E* (2009) The effect of COMT Val158Met genotype on decision-making and preliminary findings on its interaction with the 5-HTTLPR in healthy females. *Neuropharmacology* 56(2): 493–498.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.10.002>

### **The Ghrelin Receptor Antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 Reduces the Risk Behavior in the Rat Gambling Model by Altering the Turnover of Dopamine and Serotonin**

**A. A. Lebedev<sup>a,\*</sup>, I. V. Karpova<sup>a</sup>, E. R. Bychkov<sup>a</sup>, N. D. Yakushina<sup>a</sup>,  
I. Yu. Thyssen<sup>a</sup>, K. E. Gramota<sup>a</sup>, N. S. Efimov<sup>a</sup>, and P. D. Shabanov<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

\**e-mail: aalebedev-iem@rambler.ru*

The effect of the ghrelin receptor antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 on the elements of gambling and monoamine metabolism in the rat brain was investigated. For three weeks, the rats were trained in a three-arm maze using the food reinforcement (sunflower seeds). During the first five days, at the end of the 1st arm, the animals received 1 seed, at the end of the 2nd arm, 2 seeds, and at the end of the 3rd arm, 3 seeds. In the following days, the reinforcement was differentiated: each entry in arm 1 was reinforced with 1 seed, each second entry in arm 2 was reinforced with 2 seeds and every third entry in arm 3 was reinforced with 3 seeds. Thus, when visiting the 1st arm, the amount of reinforcement was minimal, and the probability of its delivery was maximal. The entry to the 3rd arm was reinforced as much as possible, but with the lowest probability. Rats that had developed a stable conditional locomotion in the maze were injected intranasally with 0.9% NaCl or D-Lys3-GHRP-6 and studied the behavior. 3 days after testing the rats were re-administered with 0.9% NaCl or D-Lys3-GHRP-6. After 80 minutes, the rats were decapitated and the brain structures were isolated. HPLC was used to determine the content of dopamine, serotonin and their metabolites in the hypothalamus, hippocampus, striatum, and olfactory tubercle (the part of ventral striatum). Intranasal administration of the ghrelin receptor antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 (20 µL, 1 mg/mL) increased the number of entries into the 1st arm (with a high (100%) probability, but less reinforcement). No significant changes were found in the content of dopamine and serotonin after [D-Lys3]-GHRP-6 administration in the hypothalamus. The serotonin content significantly increased in the left hippocampus. The turnover of monoamines in the olfactory tubercle and striatum changed only in the right hemisphere, while the ratio of the content of 5-hydroxyindoleacetic acid to the content of serotonin increased in both structures. In the right striatum, these changes were also accompanied by an increase in the content of serotonin and dopamine metabolites. Thus, the ability of [D-Lys3]-GHRP-6 to change the strategy of choice in favor of the greatest probability, but the least amount of reinforcement, is based on an increase in the activity of the dopaminergic and serotonergic systems in the dorsal and ventral striatum of the right hemisphere of the brain and the serotonin content in the hippocampus of the left hemisphere.

*Keywords:* ghrelin, [D-Lys3]-GHRP-6, gambling, dopamine, serotonin

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ПРОЦЕССОВ ЗРИТЕЛЬНОГО ПРАЙМИНГА

© 2021 г. Л. В. Черенкова<sup>1</sup>, \*, Л. В. Соколова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: chluvic@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2021 г.

После доработки 04.07.2021 г.

Принята к публикации 05.07.2021 г.

В целях исследования возрастного развития процессов зрительного прайминга проводили сравнение характеристик влияния априорной зрительной информации на идентификацию объектов разной степени сложности у детей четырех (20 детей), пяти (20 детей) и шести лет (20 детей). С помощью прайминг-парадигмы анализировали зависимость величины прайминг-эффекта от интервала между тестовым и прайм-стимулами. В качестве тестовых стимулов использовали линии с разной ориентацией и пространственной частотой, рисунки зверей и клякс. В качестве прайм-стимулов предъявляли комбинированные изображения, содержащие тестовые стимулы в виде локального и глобального элементов. Сопоставление данных тестирования у детей разного возраста показало, что независимо от сложности используемых зрительных объектов величина прайминг-эффекта с возрастом снижается. При идентификации линий предъявление прайма приводило к облегчению реакции и на первый, и на второй тестовый стимул у всех детей. С возрастом наблюдалось снижение величины прайминг-эффекта и сужение временного окна облегчения реакции. Когда использовали фигуры зверей, у детей четырех и пяти лет положительный прайминг наблюдали при идентификации двух тестовых объектов, а у детей шести лет ускорение реакции отмечалось только на стимул, представленный в прайме как глобальный элемент. При различении фигур клякс у детей четырех лет прайм вызывал увеличение времени реакции, а у детей пяти и шести лет — ее ускорение. В то же время у детей пяти лет по сравнению с шестилетними величина положительного прайминг-эффекта была ниже, и облегчение реакции начиналось при больших значениях межстимульного интервала. Полученные данные свидетельствуют о том, что механизмы зрительного прайминга у детей младших возрастных групп могут быть реализованы при идентификации знакомых и простых объектов, антиципирующие схемы для которых уже сформированы.

*Ключевые слова:* зрительный прайминг, временная динамика, дошкольный возраст, возрастная динамика

DOI: 10.31857/S086981392109003X

Зрительный прайминг представляет собой изменение способности идентифицировать, воспроизводить или классифицировать объекты под влиянием восприятия априорной зрительной информации [1]. В поведенческих исследованиях влияние вариаций прайм-стимулов на эффективность восприятия оценивается по изменению успешности и времени реакции [2], а в нейрофизиологических работах — по параметрам связанных с событием потенциалов [3]. В ходе взаимодействия априорной и текущей информации могут изменяться пороги обнаружения стимулов, пороги их различения, успешность и скорость идентификации зрительных

объектов [1, 2]. При этом отмечают как улучшение (положительный прайминг-эффект), так и ухудшение (отрицательный прайминг-эффект) зрительного восприятия в зависимости от характеристик как прайма, так и тестовой стимуляции и условий их предъявления [4, 5]. По степени и глубине переработки зрительной информации различают сенсорный прайминг, основанный на анализе внешнего сходства отдельных признаков априорной информации (прайма) с объектом идентификации (целевым стимулом), перцептивный, связанный с определением сходства формы внешних объектов, семантический, направленный на разделение стимулов по их значению, и категориальный, задействующий анализ категориальной принадлежности стимулов [6].

При использовании сценария “кратковременного прайминга” последовательно предъявляют прайм-стимул и тестовый стимул с интервалом, который варьирует в пределах сотен миллисекунд [1]. В настоящее время экспериментально показано, что вариации задержки по времени между моментами включения прайма и целевого стимула (*stimulus-onset asynchrony* – *SOA*) приводит к реализации механизмов обработки зрительной информации на разных уровнях сенсорной системы [7]. Так, при *SOA* до 50 мс определяющими являются периферические механизмы взаимодействия априорной и текущей информации [8]. В диапазоне *SOA* от 50 до 100 мс включаются механизмы сенсорного прайминга [9, 10]. При *SOA* в интервале 200–300 мс возникает интерференция когнитивных процессов, связанных с анализом чередующихся целевого и прайм-стимулов (перцептивный прайминг), причины которого могут быть обусловлены процессами сличения поступающей информации с той, что хранится в памяти субъекта и необходимостью переключения внимания с анализа целевого стимула на прайм и обратно [11–13]. *SOA* в интервале от 300 до 500 мс связывают с семантическим анализом сигналов и с реализацией процессов планирования двигательной реакции [14, 15].

Вопрос о механизмах формирования процессов интеграции и внимания в онтогенезе является одним из важнейших в области сенсорной и когнитивной психофизиологии. Наиболее интенсивно эти процессы развиваются в период дошкольного и младшего школьного возраста [16]. Однако большинство работ по изучению особенностей формирования зрительного прайминга в онтогенезе направлено в основном на выявление специфики речевого развития и формирования процессов восприятия семантической информации [17, 18]. Так, при рассмотрении синтаксического прайминга не наблюдали принципиальных различий в характере проявления прайминг-эффекта (ПЭ) между взрослыми и детьми, когда использовали конструкции языка, которыми дети овладевают на достаточно ранних этапах речевого развития (от четырех лет) [19, 20].

При анализе семантического прайминга была показана зависимость величины ПЭ от характера взаимосвязи между предвещающей и анализируемой информацией [21]. При использовании стимулов, которые объединены между собой ассоциациями разного типа, положительный ПЭ наблюдался уже у пятилетних детей [22]. Для пар слов, связанных категориально, положительный ПЭ был впервые обнаружен только у детей семи лет [23]. Если тестовый и прайм-стимулы были соединены между собой действием, положительный ПЭ отмечался у детей пяти лет [24]. В возрасте девяти лет наибольший ПЭ наблюдали в том случае, когда тестовый и прайм-стимулы соответствовали друг другу по смыслу [25]. При этом во всех случаях с увеличением возраста величина ПЭ снижалась [26].

Анализ исследований проявления семантического прайминга у детей разного возраста убедительно демонстрируют особенности преднастройки процесса восприятия и его селективности по сравнению с взрослыми испытуемыми. Особенно важным представляется исследование формирования этих процессов в период дошкольного детства, поскольку этот период в развитии связан с формированием функциональных систем, обеспечивающих произвольную избирательную регуляцию деятельности, основанную на процессах организации произвольного внимания [16]. Однако систематических исследований, направленных на изучение дина-

**Таблица 1.** Описание исследованных детей

Группа детей	Число детей			Возраст (в годах)		IQ по Векслеру (баллы)		
	общее	мальчики	девочки	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>Range</i>
1	20	11	9	4.5	0.4	105	13	92–118
2	20	15	5	5.6	0.3	115	15	100–130
3	20	13	7	6.4	0.4	124	14	110–138

мики формирования и развития процессов реализации всех механизмов, задействованных при зрительном прайминге на разных уровнях обработки зрительной информации у детей дошкольного возраста, не проводилось.

В связи с этим цель настоящего исследования заключалась в проведении сравнительного анализа характеристик зрительного прайминга в зависимости от типа используемого прайма, сложности задачи идентификации целевого объекта и возраста ребенка в пределах дошкольного периода.

Задачи работы включали тестирование величины ПЭ при идентификации простых зрительных стимулов, знакомых оформленных объектов и фигур неопределенной конфигурации в зависимости от интервала задержки между праймом и целевым стимулом у детей четырех, пяти и шести лет.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Испытуемые*

В исследовании принимали участие 60 детей от четырех до шести лет ( $M = 5.4$ ;  $SD = 0.8$ ), посещающих детский сад № 45 и дошкольное отделение начальной школы-детского сада № 687 “Центр реабилитации ребенка” (г. Санкт-Петербург).

В соответствии с возрастом дети были разделены на три группы: 1) 20 детей, из них 9 девочек, от 4.1 до 4.9 лет; 2) 20 детей, из них 5 девочек, от 5.2 до 5.9 лет; 3) 20 детей, из них 7 девочек, от 6.0 до 6.8 лет (табл. 1).

Все дети использовали правую руку для выполнения теста в качестве ведущей и не имели проблем со зрением и слухом.

Дети всех возрастных групп были протестированы на уровень интеллектуально-го развития по методу Векслера для детей дошкольного возраста (WPPSI), адаптированному для нашей страны [27]. Анализ результатов показал, что уровень IQ варьировал от 92 до 138 баллов, что соответствовало уровню нормального развития ребенка (см. табл. 1).

Все использованные в исследовании процедуры соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Родители детей, принимавших участие в данном исследовании, подписали информированное добровольное согласие. Проведение исследования одобрено Этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного университета (протокол № от 1 от 10.09.2017 г.).

### *Стимулы*

В качестве тестовых стимулов использовали изображения вертикальных линий с пространственной частотой 10 циклов на град. и горизонтальных линий с пространственной частотой 2 цикла на град. (задача 1), изображения фигур зверей (задача 2), изображения клякс разной конфигурации (задача 3) из базы данных “Sutterstock”.

В качестве прайм-стимулов в центре экрана компьютера предъявляли вертикальные линии с пространственной частотой 2 цикла на град. (задача 1) и комбинированные изображения, содержащие тестовые стимулы, один как общий гло-

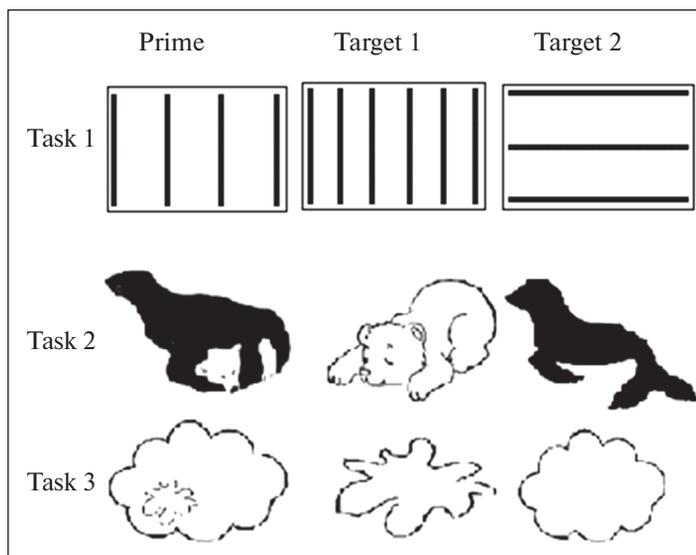


Рис. 1. Используемые стимулы.

бальный элемент изображения, второй как встроенный локальный элемент изображения (задачи 2 и 3) (рис. 1).

Яркость серого фона экрана компьютера составляла  $30 \text{ кд/м}^2$ , максимальная яркость изображения —  $60 \text{ кд/м}^2$ , размер изображения — 8 угловых градусов, длительность предъявления тестовых стимулов составляла 200 мс, а прайм-стимула — 100 мс. Межстимульный интервал между окончанием предъявления прайма и началом предъявления тестового стимула (МСИ) варьировал от 50 до 600 мс.

#### *Процедура исследования*

Обследование детей проводилось в знакомой и комфортной обстановке. Ребенок сидел перед компьютером, расстояние от экрана монитора составляло около 50 см. Общая освещенность в комнате равнялась 120 лк. Для демонстрации стимулов испытуемым был использован ноутбук Samsung R40-1 с размером экрана 17". Для предъявления стимулов и регистрации параметров реакции использовалась программа PsyTask v. 1.50.12. (ООО Мицар, Санкт-Петербург, РФ).

Перед началом тестирования проводили обучение задаче по различению тестовых стимулов. В ответ на предъявление одного из них необходимо было нажать на левую клавишу компьютера (20 стимулов), а в ответ на предъявление другого — на правую клавишу компьютера (20 стимулов). Все стимулы предъявлялись в случайном порядке.

В сериях тестирования использовали сочетания тестовых и прайм-стимулов, которые предъявляли в случайном порядке. В каждой задаче использовали два теста с разными значениями МСИ (50, 100, 150 и 200 мс; 300, 400, 500 и 600 мс). Число проб в одном тесте составляло 80 сочетаний стимулов (по 20 проб с одним значением МСИ).

#### *Анализ полученных результатов*

Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTIKA-13. Распределение переменных по всей выборке соответствовало нормальному (тест К-S:  $d = 0.15$ ;  $p > 0.21$ ), что позволило использовать для анализа параметрические критерии:  $t$ -теста Стьюдента для сравнения двух независимых выборок и многофак-

торный анализ ANOVA с последующим применением *post hoc* Бонферонни для сравнения трех и четырех групп переменных. При анализе значений времени реакции (ВР) отбирали только правильные реакции испытуемых (94,56% из всех проб). Значения ВР, которые превышали  $2SD$  от средней величины для каждого ребенка, не включали в обработку данных (1,32% из всех проб). Для каждого испытуемого вычисляли знак и среднюю величину прайминг-эффекта (ПЭ) при каждом значении МСИ, а также временное окно эффекта облегчения реакции. Знак прайминг-эффекта определяли по достоверному увеличению (положительный ПЭ) или уменьшению (отрицательный ПЭ) скорости идентификации зрительного объекта при введении прайм-стимула. Величину ПЭ определяли по разнице между средними значениями ВР при предъявлении только тестового стимула и сочетания тестового и прайм-стимулов. Временное окно эффекта облегчения определяли как период значений МСИ, при которых величина ПЭ была достоверной, т.е. попарное сравнение средних значений времени реакции на тестовые стимулы, предваряемые и не предваряемые праймом, показало достоверные различия. Достоверными считали различия при  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Обучение

Анализ данных, полученных в процессе обучения различению используемых фигур у детей разного возраста, показал, что число ошибок не превышает уровень случайности. Среднее число ошибок составляло  $2.25 \pm 1.01\%$  у детей четырех лет,  $2.11 \pm 1.02\%$  — у детей пяти лет и  $1.08 \pm 0.51\%$  — у детей шести лет. При этом среднее значение времени реакции составляло  $1047 \pm 76$  мс ( $n = 20$ ) у детей четырех лет,  $994 \pm 48$  мс ( $n = 20$ ) — у детей пяти лет и  $883 \pm 45$  мс ( $n = 20$ ) — у детей шести лет.

Сравнение ВР у детей всех возрастных групп не выявило зависимости от вида задачи по идентификации объектов разной сложности ( $F(2,357) = 2.57$ ;  $p = 0.08$ ) и от типа используемых в каждой задаче стимулов ( $F(2,357) = 1.12$ ;  $p = 0.33$ ). В то же время методом дисперсионного анализа ANOVA была установлена зависимость временных параметров реакции от возраста детей при выполнении всех трех задач ( $F(2,357) = 44.87$ ;  $p < 0.001$ ).

Попарное сравнение средних значений ВР с помощью метода Стьюдента у детей разных возрастных групп определило прогрессивный рост скорости реакции в ряду детей четырех и пяти лет, а также пяти и шести лет (табл. 2).

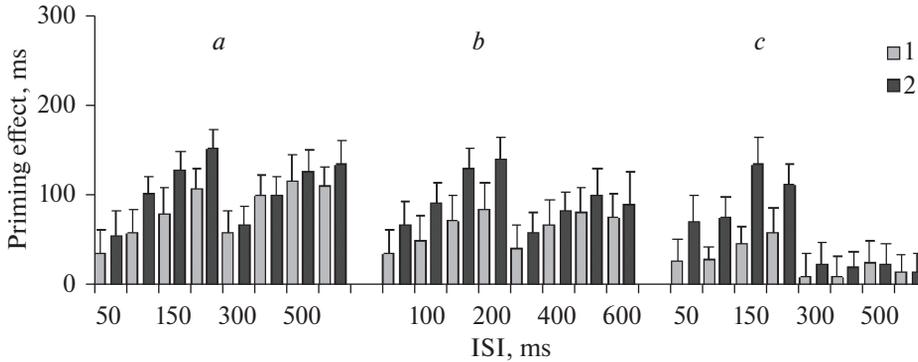
### Тестирование

При введении прайм-стимулов ВР изменялось в зависимости от возраста, выполняемой задачи, типа идентифицируемых стимулов и величины МСИ.

При различении простых стимулов (горизонтальных и вертикальных линий с низкой и высокой пространственной частотой) введение прайм-стимула в виде вертикальных линий с низкой пространственной частотой показало, что независимо от возраста наблюдается уменьшение ВР на оба тестовые стимулы — положительный ПЭ (рис. 2).

Попарное сравнение средних величин ВР на предъявление тестовых стимулов и их сочетание с праймом определило достоверное снижение ВР на оба стимула у детей четырех лет ( $M = 944$  мс,  $SD = 72$ ; ПЭ = 162 мс;  $t(38) = 4.76$ ,  $p < 0.001$ ), пяти лет ( $M = 941$  мс,  $SD = 64$ ; ПЭ = 70 мс;  $t = 4.76$ ,  $p < 0.001$ ) и шести лет ( $M = 849$  мс,  $SD = 43$ ; ПЭ = 46 мс;  $t(38) = 4.76$ ,  $p < 0.001$ ).

При этом, если у детей четырех и пяти лет достоверные значения ПЭ были зафиксированы при всех значениях МСИ (рис. 2а, б), то у детей шести лет временное окно облегчения реакции было ограничено (50–200 мс — рис. 2с).



**Рис. 2.** Возрастная динамика проявления прайминг-эффекта при различии линий разной ориентации и частоте следования. Обозначения: (a) – тестирование детей четырех лет; (b) – тестирование детей пяти лет; (c) – тестирование детей шести лет; (1) – прайм + тестовый стимул 1; (2) – прайм + тестовый стимул 2. По вертикали – средняя величина прайминг-эффекта, мс; по горизонтали – значение межстимульного интервала, мс. Вертикальные линии – значение доверительного интервала при  $p \leq 0.05$ .

Методом дисперсионного анализа ANOVA выявлено достоверное влияние фактора возраста ( $F(2,949) = 41.01; p < 0.001$ ), типа стимула ( $F(1,949) = 63.14; p < 0.001$ ) и МСИ ( $F(7,949) = 17.17; p < 0.001$ ) при значимой величине взаимодействия данных факторов ( $F(2,949) = 108.17; p < 0.001$ ).

Анализ зависимости величины ПЭ от возраста определил достоверное снижение эффекта облегчения при воздействии априорной информации в возрастном ряду от четырех до пяти лет. Уменьшение ВР на тестовые стимулы была наибольшей у детей четырех лет по сравнению с детьми пяти ( $t(318) = 5.41; p < 0.001$ ) и шести ( $t(318) = 8.37; p < 0.001$ ) лет.

Сравнение средних значений ПЭ на первый и второй тестовые стимулы, предваряемые праймом, подтвердил достоверность различий ВР на вертикальные и горизонтальные линии у детей четырех ( $t(38) = 3.81; p < 0.001$ ), пяти ( $t(38) = 4.18; p < 0.001$ ) и шести ( $t(38) = 5.07; p < 0.001$ ) лет. Необходимо отметить, что совпадение частоты следования в прайме и тестовом стимуле приводило к большему ПЭ по сравнению с совпадением направления ориентаций линий у детей всех возрастных групп (рис. 2).

Детальный анализ зависимости величины ПЭ от МСИ выявил различия в интервалах от 50 до 200 мс и от 300 до 600 мс.

**Таблица 2.** Временные параметры идентификации тестовых стимулов после обучения

Стимулы	Возраст (годы)	Время реакции (мс)			Тест Стьюдента	
		Mean	SD	Range	t	p
Линии	4	1106	72	913–1152	2.66	0.02
	5	1011*	56	849–1151		
	6	895*	42	803–991		
Звери	4	1062	75	903–1125	3.92	0.002
	5	983*	38	901–1081		
	6	865*	36	710–1012		
Кляксы	4	1102	92	971–1288	2.52	0.02
	5	963*	42	851–1080		
	6	888*	47	807–986		

\* Указана достоверность различий данных при  $p \leq 0.05$ .

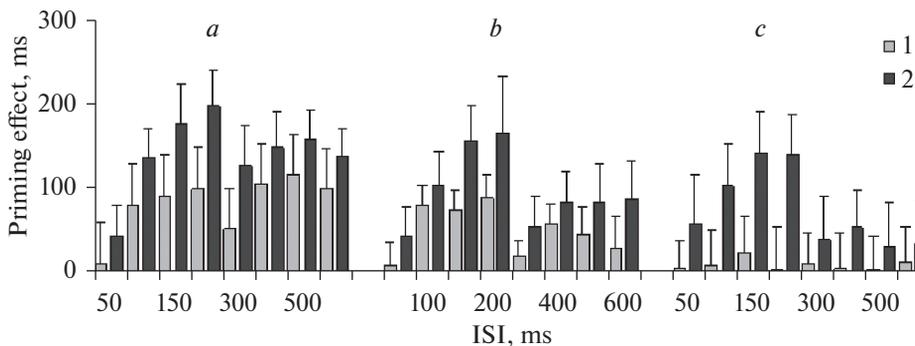


Рис. 3. Возрастная динамика проявления прайминг-эффекта при различии фигур зверей. Обозначения, как на рис. 2.

При МСИ до 200 мс величина ПЭ на тестовые стимулы прогрессивно увеличивается у детей всех возрастных групп ( $F(3,76) = 4.01; p = 0.01; F(3,76) = 3.75; p = 0.03, F(3,76) = 3.17; p = 0.04$ , у детей 4-х, 5-ти и 6-ти лет соответственно). В то же время при МСИ более 300 мс достоверные изменения ВР отсутствуют ( $F(3,76) = 1.51; p = 0.18, F(3,76) = 1.15; p = 0.13, F(3,76) = 0.71; p = 0.55$ , у детей четырех, пяти и шести лет соответственно).

Такая же закономерность просматривается и для различий между средними значениями ВР на первый и второй тестовые стимулы. В интервале МСИ от 50 до 200 мс ВР реакции было достоверно ниже при идентификации редких горизонтальных линий – второй стимул ( $t(78) = 3.53; p < 0.001, t(78) = 4.05; p < 0.001, t(78) = 4.93; p < 0.001$  у детей 4-х, 5-ти и 6-ти лет соответственно). При МСИ от 300 до 600 мс достоверные различия между средними значениями ВР на тестовые стимулы не наблюдается ( $t(78) = 1.87; p = 0.06, t(78) = 1.96; p = 0.05, t(78) = 1.03; p < 0.01$  у детей четырех, пяти и шести лет соответственно).

Таким образом, при выполнении данной задачи положительный зрительный прайминг отмечается уже у детей четырех лет. Возрастные различия состоят в снижении выраженности ПЭ и в уменьшении временного окна эффекта облегчения с возрастом.

Опережающая демонстрация комбинированной фигуры, состоящей из изображений зверей в качестве глобального и локального элементов стимула, продемонстрировала несколько иные результаты. В этом случае также наблюдалось уменьшение ВР при различии тестовых фигур – положительный прайминг-эффект (рис. 3).

Однако у детей четырех и пяти лет уменьшение ВР отмечалось на оба тестовых стимула ( $M = 943$  мс,  $SD = 29$ , ПЭ = 119 мс;  $t(318) = 2.48, p < 0.001; M = 872$  мс,  $SD = 30$ , ПЭ = 111 мс;  $t(318) = 1.73, p < 0.001$  соответственно), а у детей шести лет – только на стимул, который был представлен в прайме как глобальный элемент фигуры ( $M = 758$  мс,  $SD = 28$ , ПЭ = 85 мс;  $t(318) = 2.53; p < 0.001$ ). Необходимо отметить, что у детей четырех и пяти лет достоверные значения ПЭ были зафиксированы при всех значениях МСИ при идентификации первого стимула и в интервале МСИ от 100 до 600 мс при реакции на второй стимул (рис. 3а, б). У детей шести лет временное окно облегчения реакции было ограничено (50–200 мс – рис. 3с).

Методом дисперсионного анализа было показано достоверное влияние фактора возраста ( $F(2,949) = 32.28; p < 0.001$ ), типа стимула ( $F(1,949) = 96.04; p < 0.001$ ) и МСИ ( $F(7,949) = 1.01; p < 0.001$ ) при значимой величине взаимодействия данных факторов ( $F(2,949) = 469.98; p < 0.001$ ).

Анализ зависимости величины ПЭ от возраста показал, что уменьшение ВР на тестовые стимулы была наибольшей у детей четырех лет по сравнению с детьми пя-

ти ( $t(318) = 3.15; p < 0.001$ ) и 6-ти ( $t(318) = 5.38; p < 0.001$ ) лет (рис. 3). При этом, как и в случае тестирования первой задачи, выраженность ПЭ снижалась с возрастом.

Детальный анализ зависимости величины ПЭ от МСИ свидетельствует о том, что в интервале 50–200 мс регистрируется прогрессивный рост скорости реакции на оба тестовых стимула у детей четырех и пяти лет ( $F(3,76) = 2.97; p = 0.04$  и  $F(3,76) = 4.71; p = 0.01$  соответственно) и только на изображение, выступающее в качестве глобального элемента в прайме, у детей шести лет ( $F(3,76) = 5.58; p = 0.01$ ). При МСИ более 300 мс величина ПЭ снижается и ее зависимость от значения МСИ не достигает достоверных значений у детей всех возрастных групп ( $F(3,76) = 1.28; p = 0.29$ ,  $F(3,76) = 0.37; p = 0.56$ ,  $F(3,76) = 0.37; p = 0.78$  у детей четырех, пяти и шести лет соответственно).

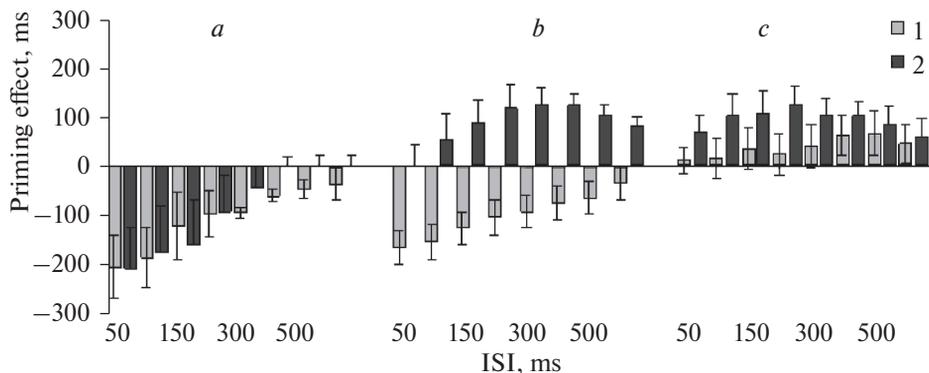
Попарное сравнение средних величин ПЭ в ответ на предъявление тестовых стимулов позволило установить, что ВР на первый стимул (глобальный элемент прайма) было достоверно меньше по сравнению с ВР на второй стимул (локальный элемент прайма) у детей всех возрастных групп при всех значениях МСИ ( $t(76) = 4.34; p < 0.001$ ,  $t(76) = 4.83; p < 0.001$ ,  $t(76) = 4.51; p < 0.001$  у детей четырех, пяти и шести лет соответственно).

Таким образом, у детей шести лет при распознавании фигур зверей введение прайм-стимула (сочетание двух тестовых фигур, одна из которых представляла локальный, а другая глобальный элементы комбинированного изображения) приводило к достоверному снижению ВР только при предъявлении фигуры, представляющей глобальный элемент изображения. Достоверные различия значений ВР на тестовые стимулы, предворяемые праймом, сохранялись при всех исследованных значениях МСИ. Максимальный эффект облегчения ВР регистрировали в интервале МСИ от 100 до 200 мс. В то же время у детей четырех и пяти лет наблюдается снижение ВР на оба стимула, хотя эффект облегчения в большей мере сказывается на идентификации тестового стимула, который в априорной информации выступает как глобальный элемент комбинированного изображения.

Несколько иная картина была характерна для различения стимулов неопределенной конфигурации (кляксы) после введения прайм-стимула, представляющего собой комбинацию тестовых изображений, одно из которых представляло глобальный элемент стимула, а второе – его локальный элемент. В этом случае наблюдались не только количественные, но и качественные различия проявления ПЭ у детей разного возраста (рис. 4).

Как и при выполнении первых двух задач, методом дисперсионного анализа было установлено достоверное влияние фактора возраста ( $F(2,949) = 130.47; p < 0.001$ ), типа тестового стимула ( $F(2,949) = 134.49; p < 0.001$ ) и МСИ ( $F(2,949) = 14.73; p < 0.001$ ) при значимой величине взаимодействия данных факторов ( $F(2,949) = 17.71; p < 0.001$ ).

Однако у детей четырех лет опережающее предъявление прайма приводило к достоверному увеличению ВР на оба тестовых стимула в интервале МСИ от 50 до 300 мс ( $M = 1244$  мс,  $SD = 58$ , ПЭ =  $-142$  мс;  $t(98) = 5.89, p < 0.001$ ) – отрицательный ПЭ (рис. 4а). В то же время у детей пяти лет достоверный отрицательный ПЭ наблюдается только при выполнении реакции на тестовый стимул, включенный в прайм как локальный элемент, независимо от МСИ ( $M = 1129$  мс,  $SD = 76$ , ПЭ =  $-105$  мс;  $t(158) = 1.13; p = 0.02$ ). При предъявлении второго тестового стимула (глобальный элемент прайма) ВР достоверно уменьшалось в интервале МСИ от 150 до 600 мс ( $M = 954$  мс,  $SD = 66$ , ПЭ =  $84$  мс;  $t(118) = 3.44; p < 0.001$  – положительный ПЭ – рис. 4б). У детей шести лет также наблюдалось достоверное уменьшение ВР на данный тестовый стимул, но при всех значениях МСИ ( $M = 773$  мс,  $SD = 38$ , ПЭ =  $91$  мс;  $t(158) = 4.87; p < 0.001$ ). Однако в ответ на стимул, включенный в прайм в качестве локального элемента, достоверных изменений величины ВР не было зафиксировано ни при одном значении МСИ ( $M = 886$  мс,  $SD = 49$ , ПЭ =  $2$  мс;  $t(158) = 0.83; p = 0.45$  – рис. 4с).



**Рис. 4.** Возрастная динамика проявления прайминг-эффекта при различии фигур неопределенной конфигурации. Обозначения как на рис. 2.

Дисперсионный анализ ПЭ при разных МСИ показал, что у детей четырех лет негативное влияние прайма прогрессивно уменьшается с увеличением МСИ в интервале от 50 до 300 мс ( $F(7,152) = 4.12; p < 0.01$ ). У детей пяти лет с ростом МСИ негативное влияние прайма также достоверно уменьшается относительно тестового стимула, включенного в прайм как локальный элемент ( $F(7,152) = 5.89; p < 0.001$ ), а в отношении стимула, входящего в прайм как глобальный элемент изображения, положительное влияние прайма возрастает при увеличении МСИ ( $F(7,152) = 3.23; p < 0.01$ ). Необходимо отметить, что в последнем случае достоверное увеличение ПЭ отмечено только для МСИ, больших 100 мс (рис. 4b).

У детей шести лет достоверное снижение ВР наблюдается при всех значениях МСИ (начиная с 50 мс), а максимальный рост облегчающего эффекта прайма характерен для интервала МСИ в 50–200 мс ( $F(3,76) = 3.35; p = 0.02$ ). При МСИ 300–600 мс зависимость величины положительного ПЭ от МСИ недостоверна ( $F(3,76) = 3.61; p = 0.23$ ). Также недостоверным является и зависимость величины ПЭ от МСИ при тестировании ответов на второй тестовый стимул ( $F(3,76) = 6.11; p = 0.43$  – рис. 4с).

Анализ зависимости величины ПЭ от типа стимула показывает, что у детей четырех лет достоверные различия между ВР на первый и второй тестовые стимулы отсутствуют ( $t(58) = 1.18; p = 0.24$ ) при МСИ 50, 100 и 150 мс). У детей пяти и шести лет при этих же значениях МСИ различия ПЭ между реакциями на тестовые стимулы достоверны ( $t(158) = 17.32; p < 0.001$  и  $t(158) = 6.31; p < 0.001$  соответственно).

Таким образом, при выполнении третьей задачи у детей четырех лет отмечается негативное влияние прайма на процесс идентификации последующего объекта независимо от того, является ли он глобальным или локальным элементом прайма. У детей пяти и шести лет в этой задаче был выявлен эффект облегчения реакции при идентификации объекта в отношении стимула, присутствующего как глобальный элемент в прайме. При этом временное окно облегчения реакции у детей пяти лет сдвинуто в сторону больших значений МСИ по сравнению с детьми шести лет.

Количественное сравнение величины ПЭ при выполнении разных задач у детей одного возраста показало, что у детей четырех лет относительная величина ПЭ достоверно не отличается при выполнении всех трех задач ( $F(2,238) = 1.51; p = 0.13$ ). У детей пяти и шести лет наименьшие показатели ПЭ характерны для выполнения третьей задачи ( $t = 2.14; p = 0.03$ ).

В целом, полученные результаты раскрывают временную динамику взаимодействия априорной и текущей зрительной информации и устанавливают закономерности формирования зрительного прайминга у детей дошкольного возраста.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в работе данные позволили выделить несколько аспектов возрастной динамики зрительного прайминга при восприятии зрительных объектов разной степени сложности.

В первую очередь необходимо отметить, что с возрастом изменяется выраженность зрительного прайминга. Полученные в работе данные свидетельствуют о достоверном снижении величины ПЭ от четырех до шести лет при выполнении первых двух задач. Эти данные согласуются с работами, проведенными с использованием метода семантического прайминга [26] и подтверждают предположение о том, что именно в период дошкольного детства происходит формирование механизмов зрительного прайминга.

Второй аспект возрастной динамики касается временных параметров взаимодействия априорной и текущей зрительной информации. При исследованиях с использованием прайминг-парадигмы было показано, что очень важной характеристикой прайм-стимула, которая оказывает влияние на величину и знак прайминг-эффекта, является величина интервала между целевым и прайм-стимулами [9]. Нейрофизиологические исследования показывают, что когда два образа предъявляются с интервалом от начала прайма (SOA) менее чем 300 мс, группы зрительных нейронов в верхне-височной коре пытаются кодировать наличие двух отдельных объектов, что приводит к уменьшению влияния прайма [11]. В нашем исследовании в большинстве случаев при МСИ 50–200 мс (SOA = 150–300 мс) наблюдался прогрессивный рост величины ПЭ, что, по-видимому, и отражает процесс конкуренции между априорной и текущей информацией. Этот процесс не зависел от возраста, что свидетельствует о его зрелости уже у детей четырех лет. И только при идентификации фигур сложной конфигурации у детей пяти лет наблюдается сдвиг этого периода в сторону больших значений. Интервал для различения элементов прайма в этом случае занимает от 200 до 400 мс (по SOA).

В интервале МСИ от 300 до 600 мс выявлена стабилизация значений ПЭ. Показано, что отсутствие влияния прайма на ВР в ответ на тестовый стимул связано со сдвигом внимания от прайм-стимула к тестовому сигналу [28]. Таким образом, в нашей работе МСИ = 300 мс является критической величиной для восприятия используемых праймов. Однако при этом у детей шести лет ВР при таких МСИ достоверно не отличается от той, которая была зафиксирована при отсутствии прайма. В то же время у детей младших возрастных групп стабилизация ПЭ проходит при сохранении эффекта облегчения реакции от воздействия прайма. Это может быть связано с достоверно большими значениями ВР, наблюдаемыми у детей младшего возраста. Предполагают, что временной интервал свыше 500 мс связан с активацией моторных процессов [9]. Можно предположить, что длительная реализация моторных процессов требует поддержания активации систем восприятия на высоком уровне. Это подтверждается и тем, что у детей пяти лет значения ВР у которых достоверно меньше, чем у детей четырех лет, в этом интервале МСИ отмечаются и достоверно меньшие значения ПЭ.

Третий аспект возрастной динамики зрительного прайминга относится к зависимости величины ПЭ от свойств идентифицируемых объектов. При выполнении всех задач эффект облегчения под воздействием одного и того же прайма был выше при предъявлении одного из тестовых стимулов. С возрастом увеличивались различия между величинами ПЭ на тестовые стимулы. Так, в случае различения линий разной ориентации и пространственной частоты меньшее ВР отмечалось при совпадении в прайме и тестовом стимуле частотного признака объектов по сравнению с признаком направления линий. Это свидетельствует о более выраженном влиянии низкой пространственной частоты априорной информации на время идентификации текущих объектов. Полученный факт согласуется с нашими предыдущими поведенческими и электрофизиологическими данными, показыва-

ющими влияние зрительных стимулов с низкой пространственной на различение стимулов с высокой и низкой пространственной частотой [29, 30].

В случае различения фигур зверей и клякс в большинстве случаев достоверно большая величина ПЭ наблюдалась при идентификации той фигуры, которая в прайме была представлена в качестве глобального элемента комбинированного изображения. Сравнение с работами, проведенными на взрослых испытуемых, не показывают качественных отличий в проявлении прайминг-эффектов и эффектов облегчения при восприятии таких зрительных изображений [31, 32].

Четвертый аспект возрастной динамики зрительного прайминга, выявленный в нашей работе, связан с типом предлагаемой детям задачи. При различении простых зрительных стимулов и знакомых фигур зверей положительный ПЭ наблюдался уже у детей четырех лет. Возрастные изменения зрительного прайминга в случае использования в качестве объектов идентификации простых зрительных стимулов заключались в уменьшении выраженности ПЭ. Это свидетельствует о том, что механизмы сенсорного прайминга, связанные с сопоставлением информации об отдельных признаках объектов в априорной и текущей информации, в основном, сформированы к четырехлетнему возрасту, что согласуется с данными о влиянии цвета текста на идентификацию формы объектов [25].

При различении знакомых фигур зверей у детей шести лет зрительный прайминг был установлен только при идентификации фигуры, которая в прайме представляла глобальный элемент изображения, что согласуется с данными, полученными на взрослых испытуемых и подростках [32]. Факт о ведущей роли глобальной информации при реализации зрительного прайминга в литературе рассматривается с точки зрения о преимущественной роли низкочастотной зрительной информации при идентификации формы объекта [33]. Наличие этого процесса у детей шести лет свидетельствует о зрелости перцептивного прайминга в этом возрасте.

Напротив, у детей четырех и пяти лет наблюдали облегчающее влияние как глобального, так и локального элементов прайма, хотя величина ПЭ была достоверно больше при идентификации стимула, соответствующего глобальному элементу прайма. Это говорит о том, что от четырех до пяти лет происходит формирование процесса автоматического выделения ведущего признака комбинированного объекта, которое завершается к шестилетнему возрасту.

При различении фигур сложной конфигурации была выявлена близкая по характеру картина. У детей шести и пяти лет так же, как и в предыдущем случае, обнаружено влияние априорной информации, связанной с ее глобальными элементами, но ПЭ был выражен в меньшей степени по сравнению со второй задачей. В отличие от этого у детей четырех лет установлен негативный ПЭ на оба идентифицируемых объекта, а у детей пяти лет на объект, включенный в прайм в качестве локального элемента. Вопрос относительно механизмов проявления негативного прайминга до сих пор дискутируется в литературе. Существует две основные гипотезы относительно его природы [34, 35]. Первая из них рассматривает ПЭ как проявление механизмов конкуренции между внешними объектами. При несоответствии между ними на уровне репрезентации образов объектов в ассоциативных зонах коры подавляется информация о прайм-стимуле для облегчения выбора информации о целевом стимуле, который является актуальным при выполнении реакции [34]. Вторая модель основывается на предположении о том, что целевой стимул является сигналом для извлечения из памяти предыдущих эпизодов обработки информации о таком же стимуле, причем в этих следах памяти хранится и информация об ответных реакциях на этот стимул [35]. Эти две модели во многом схожи между собой. Но при этом они различаются в понятиях того, чему придается особое значение в последовательности процессов, вовлеченных в восприятие прайм-стимула и теста. Увеличение ВР на все тестовые стимулы у детей 4-х лет, наблюдаемое в данной работе, в большей степени связано с первой гипотезой – введение любого нового

объекта в этом возрасте вызывает сильную ориентировочную реакцию, что приводит к торможению текущей деятельности в целом [34]. Этот факт подтверждается тем, что одинаковый по величине отрицательный ПЭ характерен для идентификации обоих тестовых стимулов, это подтверждается и нашими предыдущими данными о формировании гетеросенсорного прайминга, которые показали аналогичную картину у детей четырех лет при влиянии априорной зрительной информации на идентификацию звуковых стимулов [36]. С возрастом выраженность этого процесса постепенно снижается, и у детей пяти лет наблюдается негативный ПЭ только в отношении идентификации объекта, который в прайме присутствует как локальный элемент изображения, а в возрасте шести лет полностью исчезает. Такая динамика проявления отрицательного прайминга может свидетельствовать о постепенном формировании механизмов конкуренции между априорной и текущей информацией в рассмотренном возрастном периоде.

В целом полученные данные позволяют раскрыть возрастную динамику формирования сенсорного и перцептивного прайминга в зависимости от характеристик взаимодействующей информации и подтверждают предположение о том, что именно в период дошкольного детства процессы интеграции и внимания преобразуются и постепенно приобретают характер, который учитывает не только пространственно-временную композицию стимулов, но и процессы селекции значимых признаков объектов.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-06-00644-ОГН-а).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Л.В.Ч., Л.В.С.), психологическое тестирование и обработка данных (Л.В.С.), психофизиологическое тестирование и обработка данных (Л.В.Ч.), написание статьи (Л.В.Ч.), редактирование манускрипта (Л.В.С.)

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Grill-Spector K* (2008) Visual Priming. In book: *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*. USA Acad Press 3: 219–236.  
<https://doi.org/10.1016/B978-012370509-9.00130-3>
2. *Gary SD, Victor SF* (2016) Thirty years of structural priming: An introduction to the special issue. *J Memory and Language* 91: 1–4.  
<https://doi.org/10.1016/j.jml.2016.05.005>
3. *Tan D, Touzel JB, Segal MJ, Snidal C, Renault L* (2019) A central component of the N1 event-related brain potential could index the early and automatic inhibition of the actions systematically activated by objects. *Front Behav Neurosci* 13: 95.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00345>
4. *Ben-Haim MS, Chajut E, Hassin RR, Algom D* (2015) Speeded naming or naming speed? The automatic effect of object speed on performance. *J Psychol: General* 144: 326–338.  
<https://doi.org/10.1037/a0038569>
5. *Mayr S, Buchner A* (2015) Negative Priming as a Memory Phenomenon. *Zeitschr Psychol (J Psychol)* 215: 35–51.  
<https://doi.org/10.1027/0044-3409.215.1.35>
6. *Biederman I, Cooper EE* (1992) Size invariance in visual object priming. *J Exp Psychol: Human Perception and Performance* 18(1): 121–133.  
<https://doi.org/10.1037/0096-1523.18.1.121>

7. *Kristjansson A, Asgeirsson AG* (2019) Attentional Priming: Recent insights and current controversies. *Current Opinion in Psychology* 29: 71–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2018.11.0133>
8. *Tapial E, Breitmeyer B, Broyles EC* (2011) Properties of spatial attention in conscious and non-conscious visual information processing. *Consciousness and Cognition* 20: 426–431.  
<https://doi.org/10.1016/j.concog.2010.07.001>
9. *Carlson T, Tovar DA, Alink A, Kriegeskorte N* (2013) Representational dynamics of object vision: the first 1000 ms. *J Vision* 13: 1–19.  
<https://doi.org/10.1167/13.10.1>
10. *Lin Z, He S* (2012) Automatic frame-centered object representation and integration revealed by iconic memory, visual priming, and backward masking. *J Vision* 12: 1–18.  
<https://doi.org/10.1167/12.11.24>
11. *Keysers C, Perrett DI* (2002) Visual masking and RSVP reveal neural competition. *Trends in Cognitive Sci* 6: 120–125.  
[https://doi.org/10.1016/S1364-6613\(00\)01852-0](https://doi.org/10.1016/S1364-6613(00)01852-0)
12. *Proverbio AM, Adorni R, D'Aniello GE* (2011) 250 ms to code for action affordance during observation of manipulable objects. *Neuropsychologia* 49: 2711–2717.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2011.05.019>
13. *Huang Y, Chen L, Luo H* (2015) Behavioral Oscillation in Priming: Competing Perceptual Predictions Conveyed in Alternating Theta-Band Rhythms. *J Neurosci* 35: 2830–2837.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4294-14.2015>
14. *González-Perilli F, Ellis R* (2015) I don't get you. Action observation effects inverted by kinematic variation. *Acta Psychol* 157: 114–121.  
<https://doi.org/10.1016/j.actpsy.2015.02.010>
15. *Vainio L, Hammaren L, Hausen M, Rekolainen E, Riskila S* (2011) Motor inhibition associated with the affordance of briefly displayed objects. *Quart J Exp Psychol* 64: 1094–1110.  
<https://doi.org/10.1080/17470218.2010.538221>
16. *Best JR, Miller PH* (2010) A developmental perspective on executive function. *Child Development* 81: 1641–1660.  
<https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2010.01499.x>
17. *Wang Y, Wang Yo, Liu P, Wang Ju, Li Y* (2018) Critical role of top-down processes and the push-pull mechanism in semantic single negative priming. *Consciousness and Cognition* 57: 84–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.concog.2017.11.007>
18. *López-Alanís P, Fernández-Harmony T, Silva-Pereyra JF, Rodríguez-Morales MC, Prieto-Corona DMB, AVECILLA-Ramírez GN, Calderón-Carrillo M, Vélez-Domínguez LC* (2012) Semantic priming in children: an event-related potential (ERP) study. *J Behav Health & Social* 4: 59–72.  
<https://doi.org/10.5460/jbhhsi.v4.2.34108>
19. *Mahowald K, James A, Futrell R, Gibson E* (2016) A meta-analysis of syntactic priming in language production. *J Memory and Language* 91: 5–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.jml.2016.03.009>
20. *Huttenlocher J, Vasilyeva M, Shimpi P* (2004) Syntactic priming in young children. *J Memory and Language* 50: 182–195.  
<https://doi.org/10.1016/j.jml.2003.09.003>
21. *Perraudin S, Mounoud P* (2009) Contribution of the priming paradigm to the understanding of the conceptual developmental shift from 5 to 9 years of age. *Development Sci* 12: 956–977.  
<https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2009.00847.x>
22. *Jurkat S, Gruber MJ* (2021) The effect of verbal priming of visual attention styles in 4- to 9-year-old children. *Cognition* 212: 104–681.  
<https://doi.org/10.1016/j.cognition.2021.104681>
23. *Noguera C, Álvarez D, Carmona E, Parra L* (2015) Temperament and negative semantic priming in children 7 to 12 years old. *Child Neuropsychol* 21: 302–313.  
<https://doi.org/10.1080/09297049.2014.913558>
24. *Frings C, Feix S, Röthig U, Brüser C, Junge M* (2007) Children do show negative priming: Further evidence for early development of an intact selective control mechanism. *Development Psychol* 43: 1269–1273.  
<https://doi.org/10.1037/0012-1649.43.5.1269>
25. *Gathercole SF, Pickering SJ, Ambridge B, Wearing H* (2004) The structure of working memory from 4 to 15 years of age. *Development Psychol* 140: 177–190.  
<https://doi.org/10.1037/0012-1649.40.2.177>
26. *Bankson PS, Hebart BB, Groen MN* (2018) The temporal evolution of conceptual object representations revealed through models of behavior, semantics and deep neural. *Neuroimage* 178: 172–182.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.05.037>
27. *Ильина МН* (2009) Психологическая оценка интеллекта у детей. Питер, Санкт-Петербург, Россия. [Ильина MN (2009) Psychological evaluation of intelligence in children. Peter, Saint Petersburg, Russia. (In Russ)].
28. *Murphy JW, Foxe JJ, Molholm S* (2016) Neuro-oscillatory mechanisms of intersensory selective attention and task switching in school-aged children, adolescents and young adults. *Develop-*

- ment Sci 19: 469–487.  
<https://doi.org/10.1111/desc.12316>
29. Черенкова ЛВ, Соколова ЛВ (2018) Специфика участия парво- и магноцеллюлярной систем обработки зрительной информации в процессе формирования целостного образа у детей дошкольного возраста с типичным и атипичным развитием. Приложение международного научн журн Вестник психофизиол 1: 84–86. [Cherenkova LV, Sokolova LV (2018) Specificity of the participation of parvo- and magnocellular systems of visual information processing in the process of formation of a whole image in children of preschool age with typical and atypical development. Suppl Internat Scient J Psychophysiol News 1: 84–86. (In Russ)].
  30. Черенкова ЛВ, Соколова ЛВ (2018) Характеристики вызванных потенциалов на зрительные стимулы с высокой и низкой пространственной частотой у детей дошкольного возраста с атипичным развитием. Вестн психофизиол 4: 123–128. [Cherenkova LV, Sokolova LV Characteristics of evoked potentials on visual stimulus with high and low spatial frequency in preschool children with atypical development. Psychophysiol News 4: 123–128. (In Russ)].
  31. Janiszewski C, Wyer RS (2014) Content and process priming: A review. J Consumer Psychol 24: 96–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcps.2013.05.006>
  32. Kimchi R (2015) The perception of hierarchical structure: Oxford Handbook of Perceptual Organization J Wagemans (Ed). Oxford, UK: Oxford Univer Press: 129–149.
  33. Nilsson JE, Falck-Ytter T, Bölte S (2018) Local and Global Visual Processing in 3-Year-Olds With and Without Autism. J Autism Dev Disord 48: 2249–2278.  
<https://doi.org/10.1007/s10803-018-3470-8>
  34. Tipper SP (2001) Does negative priming reflect inhibitory mechanisms? A review and integration of conflicting views. Quart J Exp Psychol: Human Exp Psychol 54: 321–343.  
<https://doi.org/10.1080/02724980042000183>
  35. Labossière DI, Leboe-McGowan JP (2018) Specific and non-specific match effects in negative priming. Acta Psychol 182: 138–153.  
<https://doi.org/10.1016/j.actpsy.2017.10.009>
  36. Черенкова ЛВ, Соколова ЛВ (2020) Возрастные изменения зрительного прайминга в дошкольном возрасте. В сб XVI международ междисциплинарн конгр “Нейронаука для медицины и психологии”: 507–508. [Cherenkova LV, Sokolova LV A age-related changes in the visual priming in preschool age. In: XVI Internat Congress Proc: 507–508. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.29003/m1327.sudak.ns2020-16/507>

### Age-Related Dynamics of Visual Priming

L. V. Cherenkova<sup>a,\*</sup> and L. V. Sokolova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> St-Petersburg State University, St-Petersburg, Russia

\*e-mail: [chluvic@mail.ru](mailto:chluvic@mail.ru)

In order to study the age-related development of visual priming, we compared the characteristics of the influence of a priori visual information on the identification of objects of varying degrees of complexity in children of four ( $n = 20$ ), five ( $n = 20$ ), and six years ( $n = 20$ ). Using the priming paradigm, the dependence of the magnitude of the priming effect on the interval between the target and prime stimuli was analyzed. As targets, we used pictures of lines, animals and blots. Combined figures containing targets were presented as primes. Comparison of testing data showed that, regardless of the complexity of visual objects, the priming effect decreases with age. With the identification of lines, the reaction time decreased to both stimuli regardless of age. If animal figures were used, positive priming was observed on both targets in children of four and five years old, but in children of 6 years old, an acceleration of reaction was noted only to the target presented in prime as a global element. When presented with figures of blots, reaction times increased in four-year-olds and decreased in five and six years old. At the same time, the positive priming effect was lower and was observed at large values of the interval between prime and test in five-year-old children compared with six-year-old children. The results indicate that the mechanisms of visual priming in children of younger age groups are active when using familiar and simple objects, for which anticipatory schemes have already been formed.

**Keywords:** visual priming, temporal dynamics, pre-school age, age development

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

ИНГИБИРОВАНИЕ ГАМК-ТРАНСАМИНАЗЫ И ГАМК-ТРАНСПОРТЕРОВ  
В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ С ПОМОЩЬЮ ВИГАБАТРИНА И ТИАГАБИНА  
ОСЛАБЛЯЕТ РАЗВИТИЕ СУДОРОГ У КРЫС ПРИ ДЫХАНИИ  
ГИПЕРБАРИЧЕСКИМ КИСЛОРОДОМ

© 2021 г. И. Т. Демченко<sup>1</sup>, С. Ю. Жилев<sup>1</sup>, Т. Ф. Платонова<sup>1</sup>,  
О. С. Алексеева<sup>1, \*</sup>, Е. Р. Никитина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: osa72@inbox.ru

Поступила в редакцию 10.05.2021 г.

После доработки 23.06.2021 г.

Принята к публикации 05.07.2021 г.

Гипербарический кислород (ГБО<sub>2</sub>) угнетает ГАМК-ергическую функцию в головном мозге, что приводит к развитию судорожных реакций в виде пароксизмальных разрядов на ЭЭГ и двигательных расстройств, аналогичных генерализованному эпилептическому припадку. Мы предполагаем, что дефицит ГАМК-ергической нейротрансмиссии в ГБО<sub>2</sub>, возникающий за счет подавления синтеза ГАМК, может быть преодолен путем блокирования клиренса ГАМК из синаптической щели и замедления ее ферментативного расщепления. В настоящем исследовании изучали развитие судорожных реакций у крыс под давлением кислорода 5 АТА после блокады ГАМК-транспортеров с помощью тиагабина и ингибирования ГАМК-трансаминазы с помощью вигабатрина. В работе получены новые данные о том, что: (1) ингибирование ГАМК-трансаминазы с помощью вигабатрина или ГАМК-транспортеров с помощью тиагабина предотвращало развитие судорог у крыс под давлением кислорода 5 АТА; (2) кислородные судороги в ГБО<sub>2</sub> проявлялись при снижении ГАМК в мозге на 30–40% от исходного уровня; (3) ингибирование ГАМК-трансаминазы с помощью вигабатрина предотвращало снижение ГАМК в стриатуме крыс под давлением 5 АТА. Следовательно, замедление синаптического клиренса ГАМК или ослабление ферментативного разрушения медиатора могут значительно компенсировать ГБО<sub>2</sub>-вызванное ослабление синтеза ГАМК и повысить концентрацию тормозного медиатора до уровня, достаточного для реализации ГАМК-ергической функции, предотвращающей развитие судорожного синдрома.

*Ключевые слова:* гипербарический кислород, гипербарические кислородные судороги, ГАМК, ингибиторы ГАМК-транспортеров, ГАМК-трансаминаза, вигабатрин, тиагабин

DOI: 10.31857/S0869813921090041

## ВВЕДЕНИЕ

Кислород под давлением, превышающим атмосферное, или гипербарический кислород (ГБО<sub>2</sub>), широко используется в медицинской практике и при подводных погружениях для проведения работ в экономических и военных интересах. Несмотря на относительную безопасность, дыхание ГБО<sub>2</sub> сопряжено с риском его

токсического действия на ЦНС, клиническим проявлением которого являются пароксизмальная активность на ЭЭГ и тонико-клонические судороги, аналогичные генерализованному эпилептическому припадку [1–3].

Ключевая роль в инициировании кислородных судорог принадлежит интенсивно образующимся при гипероксии редокс-молекулам – реактивным формам кислорода (ROS) и азота (RNS), способным через окислительно-восстановительные реакции изменять молекулярную структуру клеток и нарушать межклеточное взаимодействие. Подтверждением этому является повышенное образование в мозге при ГБО<sub>2</sub> компонентов ROS – супероксиданионов (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), гидроксильных радикалов (OH<sup>-</sup>) и перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), причем уровень их продукции возрастает с увеличением парциального давления вдыхаемого кислорода [4–6]. ГБО<sub>2</sub> также стимулирует продукцию в мозге таких RNS, как оксид азота (NO) и пероксинитрит [7, 8], и их повышение в мозговой ткани предшествует появлению пароксизмальной активности на ЭЭГ [9, 10]. Вовлечение ROS–RNS в патогенез судорожного синдрома в ГБО<sub>2</sub> подтверждается данными об ускорении судорог после введения NO-доноров (SNAP) или их задержки после подавления синтеза NO с помощью L-NAME [7]. Установлено также, что у мышей-нокаутов по нейрональной NOS судорожная реакция в ГБО<sub>2</sub> развивалась значительно позже, чем у обычных животных [11].

Участие ROS–RNS в инициировании судорог предполагает наличие редокс-чувствительных мишеней в мозге, воздействие на которые приводит к нарушению электрогенеза в мозговых нейронах и синаптической передачи. Наиболее вероятная мишень для инициирования кислородных судорог определена в ГАМК-ергической нейротрансмиссии. Установлено, что гипербарический кислород ингибирует синтез ГАМК в мозге, что приводит к ослаблению тормозной нейротрансмиссии с последующим сдвигом баланса процессов возбуждения и торможения в ЦНС [12, 13]. Доказательством этого является снижение ГАМК в межклеточной среде мозга крыс, зарегистрированное *in vivo* во время ГБО<sub>2</sub>-экспозиции с помощью микроанализа, сопряженного с высокоэффективной жидкостной хроматографией [10, 12]. Причиной уменьшения внеклеточной ГАМК в ГБО<sub>2</sub> явилось снижение активности глутаматдекарбоксилазы (GAD), катализирующей синтез тормозного медиатора в нервных клетках [14]. Угнетение ферментативной активности GAD происходит за счет ее S-нитрозилирования – присоединения группы оксида азота к тиоловым остаткам цистеина внутри белка-фермента [15].

Представленные данные допускают, что ингибирование синтеза ГАМК в головном мозге при гипероксии приводит к снижению ее выделения в синаптическую щель и, следовательно, к ослаблению тормозной медиаторной функции. В связи с этим возникает вопрос, можно ли с помощью каких-то воздействий сохранить содержание медиатора в синаптическом пространстве на уровне, достаточном для реализации полноценной тормозной нейротрансмиссии. После квантового выделения ГАМК в синаптическую щель и активации постсинаптических рецепторов, большая часть неиспользованного медиатора активно удаляется из нее путем высокоаффинного Na<sup>+</sup>-зависимого захвата медиатора нервными и глиальными клетками при участии электрогенных ГАМК-транспортеров [16]. Часть медиатора пассивно диффундирует в межклеточное пространство, где реализуется его внесинаптическая тоническая медиация [17]. Критически значимым для поддержания необходимого уровня медиатора в синапсах является его ферментативное расщепление с участием ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т), локализованной преимущественно в астроцитах головного мозга.

Мы предполагаем, что блокирование захвата ГАМК и замедление ее расщепления может увеличить содержание медиатора в синаптической щели до уровня, до-

статочного для обеспечения тормозной нейротрансдукции и, таким образом, ослабить или предотвратить развитие судорожного синдрома. Для проверки этой гипотезы в настоящей работе изучали развитие судорог в ГБОУ<sub>2</sub> у крыс, которым перед экспозицией в кислороде под давлением 5 АТА в боковой желудочек головного мозга вводили тиагабин — селективный ингибитор ГАМК-транспортеров и вигабатрин — селективный ингибитор ГАМК-трансаминазы. Для оценки содержания ГАМК в головном мозге при ГБОУ<sub>2</sub> до и после введения ингибиторов, определяли ее концентрацию с помощью внутримозгового микродиализа, сопряженного с высокопроизводительной жидкостной хроматографией. Такая постановка задачи и подход к ее решению являются новыми, так как анализ существующих баз данных показал, что изучение противосудорожной эффективности вигабатрина и тиагабина в ГБОУ<sub>2</sub> с учетом оценки динамики ГАМК в мозге до сих пор не проводилось.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на крысах линии Sprague-Dawley массой  $307 \pm 9$  г, полученных из питомника “Пушино” (Московская обл., г. Пушино, Россия). Протокол опытов одобрен Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (CIOMS, Geneva, 1985). За 5–7 дней до опытов каждому животному под наркозом (небутал, 50 мг/кг) в боковой желудочек головного мозга вводили металлическую канюлю согласно стереотаксическим координатам [18]: AP = –1.0 мм, LM =  $\pm 1.5$  мм, V = 3.5 мм. Канюля укреплялась с помощью 2-х стальных винтов, ввернутых биполярно в теменные области кости черепа, и зубопротезного цемента. Перед опытами каждому животному через канюлю в боковой желудочек мозга с помощью микрошприца (Hamilton, 20 мкл) вводили раздельно искусственный ликвор (контроль), вигабатрин и тиагабин. Препараты, полученные из Sigma Aldrich, растворяли в искусственном ликворе, и их содержание в растворе объемом 10 мкл составляло: тиагабин — 0.05 мг, вигабатрин — 0.5 мг. Животным контрольной группы вводили искусственный ликвор в объеме 10 мкл. Указанные дозы ингибиторов не вызывали двигательных нарушений (дисбаланса) у животных, которых тестировали на вращающемся стержне (Rotarod test). После введения препаратов крыс помещали в барокамеру объемом 100 л по 1–2 животных в каждом опыте. Повышение давления кислорода в камере до 5 АТА осуществляли со скоростью 1 АТА/мин. Температуру в камере поддерживали в пределах 23–25°C, влажность — около 60%, содержание CO<sub>2</sub> не превышало 0.05%.

Во время ГБОУ<sub>2</sub>-экспозиции проводили непрерывную видеорегистрацию животных в барокамере. Экспозицию продолжали до появления генерализованных клонических или тонических судорог, а при их отсутствии, максимально до 90 мин. Время декомпрессии составляло 8 мин. Для анализа результатов фиксировали время (в минутах) появления моторных судорожных реакций от начала экспозиции животных в камере при давлении кислорода 5 АТА. Для анализа результатов фиксировали время (в минутах) появления различных двигательных нарушений у животных от начала кислородной экспозиции под давлением 5 АТА. Для количественной оценки развития судорог у крыс в барокамере мы адаптировали известную шкалу судорожных состояний, позволяющую разделить тяжесть приступов на стадии: движение рта и лица, кивание головой, клонус передних конечностей, подъем с клонусом передних конечностей и подъем и падение с клонусом передних конечностей [19]. В случае отсутствия судорожных проявлений за латентный период принимали время кислородной экспозиции равное 90 мин. Всего в опытах использовано 38 крыс, разделенных на 3 группы. В контрольной группе 1 ( $n = 14$ ) животным пе-

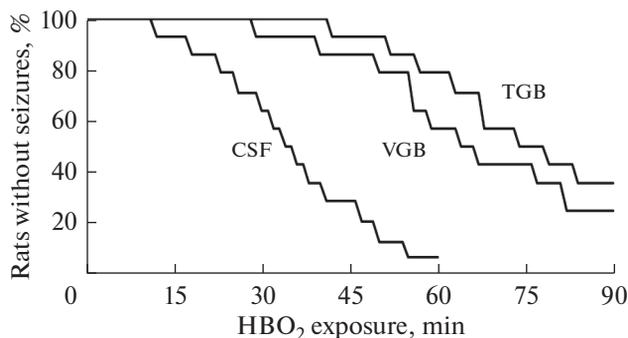
ред кислородной экспозицией при давлении 5 АТА в желудочек мозга вводили искусственный ликвор. Животным группы 2 ( $n = 12$ ) перед гипероксической экспозицией в мозговой желудочек вводили вигабатрин, а крысам группы 3 ( $n = 12$ ) — тиагабин.

В другой серии опытов на наркотизированных крысах Sprague-Dawley с помощью внутримозгового микродиализа измеряли содержание ГАМК в стриатуме во время кислородной экспозиции при 5 АТА. Эта работа выполнена И.Т. Демченко на базе Гипербарического центра университета Дьюка (Durham, NC, США). Подробное изложение метода измерений ГАМК в мозге с использованием микродиализа в ГБО<sub>2</sub> представлено в публикациях [12, 20]. Наркотизированным животным (уретан + хлоралоза, 750 + 250 мг/кг) в стриатум (координаты по [18]: AP = +1.0 мм, LM ± 2.5 мм, V = 5.8 мм) вводили микродиализные канюли (СМА/11, СМА/Microdialysis AB, Sweden). Во время ГБО<sub>2</sub>-экспозиции канюли перфузировали искусственным ликвором со скоростью 1.0 мкл/мин, а пробы диализата автоматически отбирали каждые 15 мин с помощью коллектора, расположенного в барокамере рядом с животным (СМА 142 Microfraction Collector, АВ, Швеция). Измерения ГАМК в пробах проводили сразу после декомпрессии с помощью высокопроизводительной жидкостной хроматографии (HPLC) с электрохимической детекцией ГАМК (ESA model 5100A). Содержание ГАМК в пробах диализата определяли в нмоль/л по калибровочным стандартам. Параметры ГБО<sub>2</sub>-экспозиции были такими же, как и в первой части исследований. В опытах использовано 22 животных, разделенных на 3 группы. У 7-ми животных (группа 1) и 8-ми крыс (группа 2) микродиализные канюли после имплантации в стриатум перфузировали искусственным ликвором в течение 75 мин при дыхании атмосферным воздухом (контроль), а затем под давлением кислорода 3 и 5 АТА соответственно. У животных группы 3 ( $n = 7$ ) перфузию мозговой микроканюли при дыхании воздухом и гипербарическим кислородом 5 АТА осуществляли искусственным ликвором с добавлением вигабатрина (0.7 мМ).

Статистическую оценку полученных результатов проводили с помощью дисперсионного анализа SigmaPlot 13.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, США). Однофакторный дисперсионный анализ использовали для сравнения латентных периодов судорожных реакций в ГБО<sub>2</sub> у животных при введении искусственного ликвора и ингибиторов. Двухфакторный дисперсионный анализ применяли для сравнения изменения содержания ГАМК в стриатуме крыс контрольной и экспериментальных групп. Для выявления достоверности отличий использовали парный  $t$ -критерий. Все данные представлены как  $M \pm SEM$ , при этом в качестве статистически значимых принимали значения  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У бодрствующих крыс контрольной группы во время ГБО<sub>2</sub>-экспозиции наблюдались характерные паттерны моторной судорожной активности, которые проявлялись в определенной стадийной последовательности. В наших исследованиях мы адаптировали известную шкалу судорожных состояний [19] для количественной оценки тяжести стадий кислородных судорог. После окончания компрессии животные в течение 10–15 мин оставались неподвижными. Далее у крыс появлялся интенсивный груминг, отдельные сокращения мышц рта, легкое потряхивание головы и передних лап, переходящие у части животных в кратковременные встряхивания всего тела, типа эффекта “мокрой собаки”, длительностью 1–3 с (*стадия 1*). На *стадии 2* наблюдались повторяющиеся локальные сокращения мышц мордочки, головы, передних конечностей, а также всего тела. Проявлялись непродолжительные кивания головой. Миоклонии продолжались от 5 до 15 с и могли повторяться через несколько минут. На *стадии 3* у животных появлялись ритмические сокращения мышц всего тела продолжительностью от 10 до 25 с, при этом животные



**Рис. 1.** Латентное время развития судорог у бодрствующих крыс под давлением кислорода 5 АТА после введения в мозговой желудочек искусственного ликвора (CSF), вигабатрина (VGB) и тиагабина (TGB).

могли вставать на задние лапы, пятиться назад, сильно бить хвостом. Стадия 4 у животных характеризовалась наличием генерализованных клонических или тонических конвульсий. Судорожный припадок сопровождался тахикардией, гипервентиляцией и другими признаками расстройства вегетативной нервной системы.

Выделенные стадии развития кислородных судорог в целом совпадают с известной шкалой пяти судорожных стадий [19], однако мы не нашли четких различий между стадиями 3 и 4 указанной классификации, поэтому ограничились выделением 4-х стадий в развитии судорог у крыс в ГБО<sub>2</sub>.

Стадийное развитие судорожного синдрома в ГБО<sub>2</sub> сохранялось у животных, которым предварительно вводились тиагабин или вигабатрин, однако используемые препараты задерживали появление каждой стадии по отношению к временным параметрам развития аналогичных судорожных признаков у контрольных животных. Более выраженным противосудорожным эффектом обладал тиагабин, при введении которого 4-я стадия не развивалась у 34% животных (рис. 1).

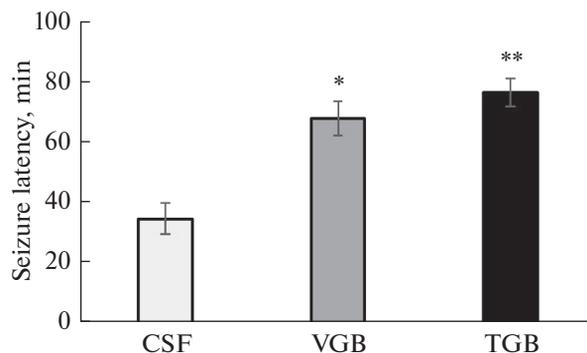
Величины латентного времени появления судорог у животных с ингибированными ГАМК-транспортерами или ГАМК-Т были достоверно больше, чем у крыс контрольной группы (рис. 2).

У наркотизированных животных признаков двигательных нарушений в ГБО<sub>2</sub> не наблюдалось, но на ЭЭГ появлялись судорожные спайки через  $68 \pm 7.4$  мин после начала экспозиции под давлением кислорода 5 АТА. Концентрация ГАМК в стриатуме наркотизированных крыс при дыхании атмосферным воздухом составляла  $58 \pm 8$  нмоль/л. Под давлением кислорода 3 АТА уровень ГАМК в стриатуме не изменился, а при 5 АТА базовое значение медиатора снизилось на  $34 \pm 5.3\%$  через 60 мин гипероксической экспозиции (рис. 3).

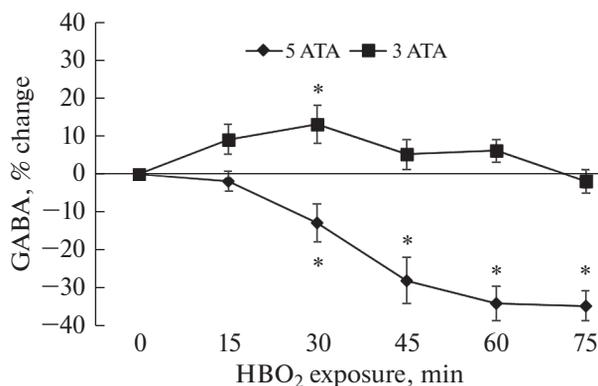
Предварительное введение крысам вигабатрина повышало уровень ГАМК в стриатуме животных при дыхании воздухом, а в ГБО<sub>2</sub> содержание медиатора снижалось достоверно меньше, чем у крыс без ингибирования ГАМК-трансаминазы (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании получено несколько новых данных: (1) ингибирование ГАМК-трансаминазы с помощью вигабатрина или ГАМК-транспортеров с помощью тиагабина ослабляло развитие судорог у крыс под давлением кислорода 5 АТА; (2) кислородные судороги в ГБО<sub>2</sub> появлялись при снижении ГАМК в стриатуме на 30–40% от исходного уровня; (3) ингибирование ГАМК-трансаминазы с



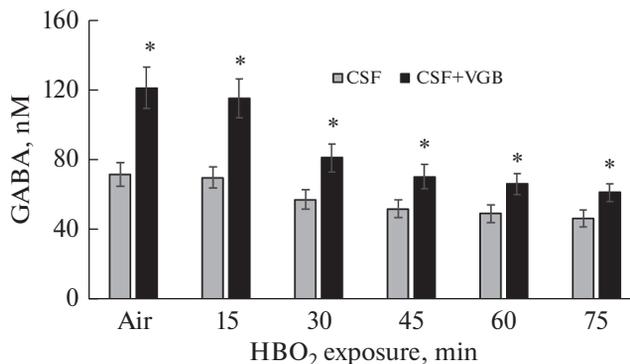
**Рис. 2.** Средние значения латентного периода появления судорог у крыс под давлением кислорода 5 АТА после введения в мозговой желудочек искусственного ликвора (CSF), вигабатрина (VGB) и тиагабина (TGB), \*  $p < 0.05$  и \*\*  $p < 0.01$  по сравнению с CSF.



**Рис. 3.** Временной профиль изменений ГАМК в стриатуме крыс под давлением кислорода 3 и 5 АТА. \*  $p < 0.05$  по сравнению с контролем (воздух).

помощью вигабатрина предотвращало снижение ГАМК в стриатуме крыс при их экспозиции в кислороде под давлением 5 АТА и значительно задерживало развитие судорог. Полученные данные позволяют проанализировать ГАМК-зависимый механизм кислородных судорог и оценить эффективность противоэпилептических препаратов для предотвращения судорожного синдрома в ГБО<sub>2</sub>.

Причастность ГАМК-ергической передачи к кислородным судорогам была установлена еще в 70-х годах прошлого столетия, когда было показано ингибирование в ГБО<sub>2</sub> ферментативной активности GAD и снижение ГАМК в головном мозге животных после их экспозиции в гипербарическом кислороде [14, 21, 22]. В опытах *in vivo* был установлен пороговый уровень понижения мозгового ГАМК в ГБО<sub>2</sub>, ниже которого появлялись судороги. Так, при дыхании кислородом под давлением 5 АТА судорожная активность на ЭЭГ у крыс появлялась, когда содержание межклеточного ГАМК, зарегистрированное с помощью внутримозгового микродиализа, снижалось на 37% [12], а в других опытах на 29% [10]. В настоящей ра-



**Рис. 4.** Изменение концентрации ГАМК в стриатуме крыс под давлением кислорода 5 АТА при перфузии микродиализной канюли искусственным ликвором (CSF) и вигабатрином (VGB), \*  $p < 0.05$  по сравнению с CSF.

боте уровень ГАМК перед кислородными судорогами понижался на 34%. Для сравнения, в нормальных условиях судороги у крыс появлялись, когда ингибирование GAD с помощью 3-меркаптопропионовой кислоты приводило к снижению ГАМК в разных структурах мозга крыс на 20–35% [23].

Какая из GAD-изоформ теряет каталитическую активность в гипербарической гипоксии остается до сих пор неясным. При этом одни авторы полагают, что это GAD67 [24], а другие – GAD65 [15]. У млекопитающих GAD существует в двух изоформах, GAD65 и GAD67, кодируемых различными генами [25]. В ГАМК-ергических нейронах мозга экспрессируются обе изоформы GAD, но их уровни экспрессии и субклеточная локализация различаются. GAD67 является цитоплазматическим ферментом, находящимся во всех телах и отростках ГАМК-ергических нейронов, тогда как GAD65 локализуется преимущественно в нервных терминалях и встроена в мембраны везикул, содержащих нейротрансмиттер. У мышей-нокаут по GAD67 наблюдается снижение концентрации ГАМК в коре головного мозга на 93%, приводящее к смерти новорожденных, и их эпилептический фенотип остается в значительной степени неизвестным [26]. С другой стороны, у мышей-нокаут по GAD65 не наблюдается значимых морфологических дефектов и не обнаруживаются значительных изменений содержания ГАМК в мозге, однако у них развиваются спонтанные эпилептиформные припадки и выявлена повышенная чувствительность к химическим веществам, вызывающим судороги [27]. Показано также, что изоформа GAD65 непосредственно регулирует выделение ГАМК из пресинаптических терминалей [28].

Несмотря на имеющиеся доказательства ингибирования GAD и снижения содержания тормозного медиатора в ГБО<sub>2</sub>, механизм подавления активности этого фермента остается малоизученным. Активность GAD понижается в ГБО<sub>2</sub> быстро, поскольку судороги при 5 АТА у большинства бодрствующих животных в настоящих опытах появлялись уже через 30–40 мин после начала кислородной экспозиции, а при 6 АТА – через 20–30 мин [7]. Очевидно, что за такой короткий период времени трудно ожидать блокирования внутриклеточного синтеза белка GAD. Наиболее вероятным механизмом потери каталитической активности фермента является посттрансляционное изменение его молекулярной структуры под действием RONS. При гипероксии генерация редокс-молекул достигает чрезмерных уровней, способных модифицировать GAD посредством окисления или нитрози-

лирования аминокислотных остатков [29]. Посттрансляционная модификация тиолсодержащих остатков цистеина (Cys) считается одним из основных драйверов редокс-сигнализации в клетках, так как они легко окисляются или нитрозилируются, причем эти реакции являются обратимыми и по скорости сопоставимы с внутриклеточной передачей сигналов [30]. Исследования показали, что механизм инактивации GAD состоит в S-нитрозилировании белка-фермента по цистеину путем присоединения к ее тиоловым остаткам группы оксида азота (NO) [15]. Такая реакция ведет к посттрансляционной модификации фермента и снижению его активности [31, 32]. Данный механизм ингибирования GAD подтверждают результаты исследований, в которых подавление синтеза NO путем системного ингибирования NO-синтаз (NOS) ослабляло развитие судорог у крыс [7], а у мышей-нокауты по нейрональной NOS время наступления судорог в ГБО<sub>2</sub> было значительно больше, чем у обычных животных [11].

В случае ингибирования GAD и снижения синтеза медиатора в ГБО<sub>2</sub> потенциально существует несколько способов усиления ГАМК-ергической функции. Агонисты и миметики ГАМК (прогабид, диазепам, фенобарбитал, пропофол) могут усиливать ингибирующую функцию медиатора, действуя на проводимость ионов хлора или на рецепторы ГАМК-A. Стимуляция синтеза и высвобождение ГАМК с помощью вальпроата или габапентина способны повышать уровень синаптической ГАМК. Замедление деградации ГАМК с помощью вигабатрина или вальпроата могут повышать внеклеточное содержание ГАМК. И, наконец, блокаторы транспортеров, например, тиагабин, способны продлевать действие ГАМК в синаптической щели. В настоящей работе была изучена возможность усиления ГАМК-ергической функции в ГБО<sub>2</sub> за счет снижения клиренса медиатора и замедления его разрушения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что блокирование транспортеров ГАМК или ингибирование ГАМК-Т восстанавливает ослабленную тормозную нейротрансмиссию в ГБО<sub>2</sub>. Справедливость этого вывода подтверждается несколькими данными. Так, у крыс с предварительно введенными в мозговую желудочек тиагабином или вигабатрином, судороги в ГБО<sub>2</sub> появлялись значительно позже, чем у контрольных животных, что может указывать на восстановление ГАМК-передачи из-за увеличения медиатора в межклеточной среде (рис. 1). Действительно, у крыс при нормоксии и атмосферном давлении ингибирование фермента ГАМК-Т с помощью вигабатрина увеличивало концентрацию ГАМК во внеклеточном пространстве более чем в 2 раза. ГАМК в стриатуме при 3 АТА кислорода достоверно не изменялся, что может свидетельствовать об относительно низкой продукции супероксид анионов и NO при таком уровне гипероксии [8, 13]. Далее, после ингибирования ГАМК-Т с помощью вигабатрина уровень медиатора в головном мозге не понижался в ГБО<sub>2</sub> ниже исходного уровня, тогда как у животных без ингибирования фермента ГАМК в стриатуме снизился на 34% (рис. 3). Так как с помощью мозгового микродиализа измеряется межклеточное содержание ГАМК, которое на 50–70% состоит из синаптического нейромедиатора [33] и некоторой части ГАМК, выделяемой из глиальных клеток [34], можно полагать, что ингибирование ГАМК-Т или ГАМК-транспортеров может увеличивать ГАМК как в синаптической щели, так и во внеклеточной среде. Все вместе свидетельствует о том, что нарушение функции ГАМК в ГБО<sub>2</sub> может быть восстановлено за счет увеличения фазовой синаптической и тонической внесинаптической ГАМК-ергической нейропередачи. Выраженный противосудорожный эффект применяемых препаратов свидетельствует о том, что ГБО<sub>2</sub> не подавляет функцию транспортеров ГАМК и ферментативную активность ГАМК-трансаминазы. В противном случае вводимые в мозг препараты не вызывали бы столь выраженного противосудорожного эффекта.

Использованные в данной работе ингибиторы продемонстрировали примерно равную противосудорожную активность. Вигабатрин ранее тестировался в опытах на мышах [35], крысах [36] и мини-свиньях [37] и проявил себя как эффективный протектор ГБОУ<sub>2</sub>-вызываемых судорог. Тиагабин был синтезирован как ГАМК-миметик, который содержит лиофильную группу, позволяющую препарату беспрепятственно проникать в мозг и оказывать противосудорожное действие. Благодаря этому свойству тиагабин нашел широкое применение в клинике для лечения эпилепсии.

Оба препарата, вводимые в желудочки головного мозга, показали высокую противосудорожную активность, однако, когда вигабатрин доставлялся в стриатум посредством микродиализа, он не проявлял противосудорожного эффекта, несмотря на повышение локального уровня ГАМК. Это согласуется с нашими более ранними данными, когда судороги в ГБОУ<sub>2</sub> предотвращались после понижения продукции NO в мозге за счет введения L-NAME в мозговые желудочки, тогда как локальное ингибирование NOS только в стриатуме не предотвращало токсического действия кислорода на ЦНС [38]. Это указывает на то, что кислородные судороги можно предотвратить только путем ингибирования ГАМК-Т или транспортеров ГАМК одновременно в различных структурах мозга, идентификация которых требует дополнительных исследований.

Таким образом, дефицит ГАМК-ергической нейротрансмиссии в ГБОУ<sub>2</sub>, который возникает из-за угнетения синтеза ГАМК, может быть компенсирован путем увеличения уровня ГАМК в синаптическом пространстве и во внеклеточной среде с помощью фармакологических препаратов. Изучение такой возможности показало, что ингибиторы ГАМК-трансаминазы и ГАМК-транспортеров повышают концентрацию медиатора в головном мозге и предотвращают развитие кислородных судорог. Следовательно, в случае подавления синтеза ГАМК в ГБОУ<sub>2</sub>, замедление клиренса медиатора из синапсов или ослабление его разрушения могут повысить концентрацию тормозного медиатора до уровня, достаточного для реализации полноценной ГАМК-ергической функции, и, тем самым, предотвратить развитие судорожного синдрома. Полученные результаты свидетельствуют о возможности практического использования вигабатрина и тиагабина для предотвращения развития кислородных судорог.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (№ 075-00408-21-00).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И.Т.Д.), сбор данных (С.Ю.Ж., Т.Ф.П., Е.Р.Н.), обработка данных (И.Т.Д., С.Ю.Ж., Е.Р.Н., О.С.А.), написание и редактирование манускрипта (И.Т.Д., О.С.А.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зальцман ГЛ (1968) Стадии развития кислородной эпилепсии и функциональное состояние нервной системы. В кн. Гипербарические эпилепсия и наркоз. Л. Наука. [Zaltsman GL (1968) Stages of formation of oxygen epilepsy and the functional state of the centres of the nervous system. In book: Hyperbaric epilepsy and narcosis. Ed. Zaltsman G.L. Leningrad. Nauka. (In Russ)].

2. *Balentine JD* (1982) Pathology of Oxygen Toxicity. New York: Academic.
3. *Селивра АИ* (1983) Гипербарическая оксигенация. Физиологические механизмы реакций центральной нервной системы на гипероксию. Л. Наука. [*Selivra AI* (1983) Hyperbaric oxygenation. Physiological mechanisms of central nervous system responses to hyperoxia. Leningrad. Nauka. (In Russ)].
4. *Torbati D, Church DF, Keller JM, Pryor WA* (1992) Free radical generation in the brain precedes hyperbaric oxygen-induced convulsions. *Free Radic Biol Med* 13(2): 101–106. <https://doi.org/10.1016/0891-5849>
5. *Dean JB, Mulkey DK, Garcia AJ, Putnam RW, Henderson RA* (2003) Neuronal sensitivity to hyperoxia, hypercapnia, and inert gases at hyperbaric pressures. *J Appl Physiol* (1985) 95(3): 883–909. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00920.2002>
6. *D'Agostino DP, Putnam RW, Dean JB* (2007) Superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. *J Neurophysiol* 98(2): 1030–1041. <https://doi.org/10.1152/jn.01003.2006>
7. *Demchenko IT, Boso AE, O'Neill TJ, Bennett PB, Piantadosi CA* (2000) Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* (1985) 88(4): 1381–1389. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.1381>
8. *Thom SR, Bhopale V, Fisher D, Manevich Y, Huang PL, Buerk DG* (2002) Stimulation of nitric oxide synthase in cerebral cortex due to elevated partial pressures of oxygen: an oxidative stress response. *J Neurobiol* 51(2): 85–100. <https://doi.org/10.1002/neu.10044>
9. *Demchenko IT, Boso AE, Whorton AR, Piantadosi CA* (2001) Nitric oxide production is enhanced in rat brain before oxygen-induced convulsions. *Brain Res* 917(2): 253–261. <https://doi.org/10.1016/s0006-8993>
10. *Zhang S, Takeda Y, Hagioka S, Takata K, Aoe H, Nakatsuka H, Yokoyama M, Morita K* (2005) Measurement of GABA and glutamate in vivo levels with high sensitivity and frequency. *Brain Res Brain Res Protoc* 14(2): 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2004.03.005>
11. *Atochin DN, Demchenko IT, Astern J, Boso AE, Piantadosi CA, Huang PL* (2003) Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(10): 1219–1226. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000089601.87125.E4>
12. *Demchenko IT, Piantadosi CA* (2006) Nitric oxide amplifies the excitatory to inhibitory neurotransmitter imbalance accelerating oxygen seizures. *Undersea Hyperb Med* 33(3): 169–174.
13. *Ciarlone GE, Hinojo CM, Stavitzski NM, Dean JB* (2019) CNS function and dysfunction during exposure to hyperbaric oxygen in operational and clinical settings. *Redox Biol* 27: 101159. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101159>
14. *Wood JD, Watson WJ* (1962) Protective action of gamma-aminobutyric acid against oxygen toxicity. *Nature* 195: 296. <https://doi.org/10.1038/195296a0>
15. *Gasier HG, Demchenko IT, Tatro LG, Piantadosi CA* (2017) S-nitrosylation of GAD65 is implicated in decreased GAD activity and oxygen-induced seizures. *Neurosci Lett* 653: 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.067>
16. *Kersanté F, Rowley SC, Pavlov I, Gutiérrez-Mecinas M, Semyanov A, Reul JM, Walker MC, Linthorst AC* (2013) A functional role for both -aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus. *J Physiol* 591(10): 2429–2441. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.246298>
17. *Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA* (2004) Tonic active GABA A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27(5): 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.005>
18. *Paxinos G, Watson C* (2005) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Boston, MA: Elsevier.
19. *Racine RJ* (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32(3): 281–294. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
20. *Donzanti BA, Yamamoto BK* (1988) An improved and rapid HPLC-EC method for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates. *Life Sci* 43(11): 913–922. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(88\)90267-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90267-6)
21. *Щербакoва ГВ* (1962) Активность глутаматдекарбоксилазы и содержание  $\gamma$ -аминомасляной кислоты в мозге крыс при разных функциональных состояниях, вызванных повышенным давлением кислорода. *ДАН СССР* 146(5): 1213–1215. [*Shcherbakova G.V.* Glutamate decarboxylase activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid content in rat brain at different functional states caused by high oxygen pressure. *DAN USSR* 146(5): 1213–1215. (In Russ)].

22. *Mialon P, Gibey R, Bigot JC, Barthelemy L* (1992) Changes in striatal and cortical amino acid and ammonia levels of rat brain after one hyperbaric oxygen-induced seizure. *Aviat Space Environ Med* 63(4): 287–291.
23. *Karlsson A, Fonnum F, Malthe-Sorensen D, Storm-Mathisen J* (1974) Effect of the convulsive agent 3-mercaptopropionic acid on the levels of GABA, other amino acids and glutamate decarboxylase in different regions of the rat brain. *Biochem Pharmacol* 23(21): 3053–3061. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(74\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(74)90281-0)
24. *Li Q, Guo M, Xu X, Xiao X, Xu W, Sun X, Tao H, Li R* (2008) Rapid decrease of GAD 67 content before the convulsion induced by hyperbaric oxygen exposure. *Neurochem Res* 33(1): 185–193. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9436-4>
25. *Soghomonian JJ, Martin DL* (1998) Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* 19(12): 500–505. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(98\)01270-x](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(98)01270-x)
26. *Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K* (1997) Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(12): 6496–6499. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6496>
27. *Kash SF, Johnson RS, Tecott LH, Noebels JL, Mayfield RD, Hanahan D, Baekkeskov S* (1997) Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 14060–14065. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14060>
28. *Tian N, Petersen C, Kash S, Baekkeskov S, Copenhagen D, Nicoll R* (1999) The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal gamma-aminobutyric acid release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12911–12916. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12911>
29. *Davis K, Foos T, Wu JY, Schloss JV* (2001) Oxygen-induced seizures and inhibition of human glutamate decarboxylase and porcine cysteine sulfinic acid decarboxylase by oxygen and nitric oxide. *J Biomed Sci* 8(4): 359–364. <https://doi.org/10.1007/BF02258378>
30. *Schulman H* (2014) *Intracellular Signaling. From Molecules to Networks (Third Edition) An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience* 119–148.
31. *Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J* (1992) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1): 444–448. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.1.444>
32. *Gould N, Doulias PT, Tenopoulou M, Raju K, Ischiropoulos H* (2013) Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J Biol Chem* 288(37): 26473–26479. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.460261>
33. *Van der Zeyden M, Oldenzijl WH, Rea K, Cremers TI, Westerink BH* (2008) Microdialysis of GABA and glutamate: analysis, interpretation and comparison with microsensors. *Pharmacol Biochem Behav* 90(2): 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.09.004>
34. *Del Arco A, Segovia G, Fuxe K, Mora F* (2003) Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? *J Neurochem* 85(1): 23–33. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01692.x>
35. *Demchenko IT, Zhilyaev SY, Moskvina AN, Krivchenko AI, Piantadosi CA, Allen BW* (2017) Antiepileptic drugs prevent seizures in hyperbaric oxygen: A novel model of epileptiform activity. *Brain Res* 1657: 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.12.032>
36. *Tzuk-Shina T, Bitterman N, Harel D* (1991) The effect of vigabatrin on central nervous system oxygen toxicity in rats. *Eur J Pharmacol* 202(2): 171–175. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(91\)90291-w](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90291-w)
37. *Hall AA, Young C, Bodo M, Mahon RT* (2013) Vigabatrin prevents seizure in swine subjected to hyperbaric hyperoxia. *J Appl Physiol* (1985)115(6): 861–867. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00221.2013>
38. *Gasier HG, Demchenko IT, Allen BW, Piantadosi CA* (2015) Effects of striatal nitric oxide production on regional cerebral blood flow and seizure development in rats exposed to extreme hyperoxia. *J Appl Physiol* (1985)119(11): 1282–1288. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00432.2015>

**Inhibition of GABA-Transaminase and GABA-Transporters  
in the Brain with Vigabatrin and Tiagabin Prevents the Development  
of Seizures in Rats Breathing Hyperbaric Oxygen**

**I. T. Demchenko<sup>a</sup>, S. Yu. Zhilyaev<sup>a</sup>, T. F. Platonova<sup>a</sup>,  
O. S. Alekseeva<sup>a, \*</sup>, and E. R. Nikitina<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry  
of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

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

Hyperbaric oxygen (HBO<sub>2</sub>) inhibits the GABAergic function in the brain, which leads to the development of convulsive reactions in the form of paroxysmal discharges on the EEG and movement disorders, similar to a generalized epileptic seizure. We hypothesize that the deficiency of GABAergic neurotransmission in HBO<sub>2</sub>, which occurs due to suppression of GABA synthesis, can be overcome by blocking the clearance of GABA from the synaptic cleft and slowing down its enzymatic degradation. The present study is aimed at studying the development of seizure reactions in rats under oxygen pressure of 5 ATA after blockade of GABA transporters with tiagabine and inhibition of GABA-transaminase with vigabatrin. New data obtained in this study are: (1) inhibition of GABA transaminase by vigabatrin or GABA transporters by tiagabine prevented the development of seizures in rats under oxygen pressure of 5 ATA; (2) oxygen convulsions in HBO<sub>2</sub> appeared with a decrease in the brain GABA by 30–40% from the initial level; (3) inhibition of GABA transaminase by vigabatrin prevented a decrease in GABA in the striatum of rats under 5 ATA pressure. Consequently, a slowdown in synaptic clearance of GABA or a weakening of the enzymatic destruction of a mediator can compensate reduced GABA synthesis in HBO<sub>2</sub> and increase its concentration to a level sufficient for the restoration of GABAergic function preventing the development of convulsive syndrome.

*Keywords:* hyperbaric oxygen, hyperbaric oxygen convulsions, GABA, inhibitors of GABA transporters, GABA-transaminase, vigabatrin, tiagabine

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ НЕФРЭКТОМИИ НА РЕАКТИВНОСТЬ  
АРТЕРИЙ СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

© 2021 г. В. Н. Ярцев\*

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

*\*E-mail: yartsev@infran.ru*

Поступила в редакцию 22.02.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята к публикации 05.07.2021 г.

В опытах на сегментах передней брыжеечной (ПБА) и внутренней сонной артерии (ВСА) крыс линии SHR изучалось влияние хронической болезни почек на констрикторные и дилататорные свойства этих артерий в изометрическом режиме. В качестве модели хронической болезни почек использовали нефрэктомия, которую осуществляли посредством удаления 5/6 почечной ткани крыс в возрасте 3 месяца. После пресокращения сосудов фенилэфрином их дилатацию вызывали ацетилхолином или нитропруссидом натрия в отсутствие и на фоне действия блокаторов калиевых каналов (тетраэтиламмония или глибенкламида) либо ингибитора гуанилатциклазы – метиленового синего. Было обнаружено значительное повышение артериального давления у нефрэктомированных животных по сравнению с контрольными. Констрикторная реакция ПБА нефрэктомированных крыс на фенилэфрин несколько снижалась относительно реакции контрольных и достоверно уменьшалась на фоне действия метиленового синего относительно исходного значения. У ВСА нефрэктомированных крыс эта реакция была значительно меньше, чем у ВСА контрольных как при отсутствии, так и на фоне действия блокаторов и ингибитора. Влияния нефрэктомии на дилататорную реакцию обеих артерий, вызванную ацетилхолином или нитропруссидом натрия, обнаружено не было, однако констрикторная фаза реакции ВСА на ацетилхолин на фоне действия глибенкламида достоверно снижалась у нефрэктомированных, но не у контрольных крыс. Делается заключение, что хроническая болезнь почек может ослаблять эндотелий-зависимые и эндотелий-независимые констрикторные реакции в большей степени у ВСА, чем у ВБА спонтанно гипертензивных крыс, при участии АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов у ВСА и гуанилатциклазы у ВБА.

*Ключевые слова:* ацетилхолин, внутренняя сонная артерия, передняя брыжеечная артерия, SHR, нефрэктомия, фенилэфрин

**DOI:** 10.31857/S0869813921090077

Хроническая болезнь почек (ХБП) в последнее время привлекает большое внимание в связи с ее широкой распространенностью и высокой смертностью, в десятки раз превышающей смертность в общей популяции [1]. Причем основной причиной смерти при ХБП являются события, связанные с нарушением работы сердечно-сосудистой системы [2–4]. Известно, что при ХБП риск смерти от сердечно-сосудистых осложнений увеличивается вследствие ускоренного развития атеросклероза, повышенной жесткости артерий и нарушения функции эндотелия. В частности, было показано, что уремические токсины, выделяющиеся в кровь при

ХБП, изменяют фенотип сосудистых гладкомышечных клеток, приводя к экспрессии коллагена и последующему ремоделированию внеклеточного матрикса сосудистой стенки [5]. Причем механизм образования отложений гидроксипатита на внутренней поверхности и внутри сосудистой стенки при ее кальцификации аналогичен механизму, имеющему место в костной ткани [6]. В опытах на крысах с использованием нефрэктомии как модели ХБП было продемонстрировано, что отмеченное многими исследователями нарушение функции эндотелия у пациентов с ХБП [7–9], в частности, связано с усилением окислительного стресса и воспаления, приводившим к уменьшению продукции оксида азота (NO) [10], а также эндотелиального гиперполяризующего фактора [11, 12].

Другим широко распространенным и опасным заболеванием, связанным с нарушением функционирования сердечно-сосудистой системы, считается гипертоническая болезнь, сопровождающаяся артериальной гипертензией, которая, согласно проведенным оценкам, поражает 16–37% населения [13] и в 2010 г. была причиной смерти в 18% случаев, а наряду с повышенным потреблением соли является во всем мире главным фактором риска смерти и потери работоспособности [14]. В исследованиях на изолированных кровеносных сосудах спонтанно гипертензивных крыс, а также людей, страдающих гипертензией, было показано, что при повышенном артериальном давлении наблюдаются структурные и функциональные изменения артерий, такие, как ремоделирование сосудистой стенки, сопровождающееся ее утолщением и повышением жесткости [15], увеличение экспрессии и чувствительности  $IP_3$ -рецепторов [16], а также значительное уменьшение эндотелий-зависимой дилатации [17–19].

Было отмечено, что гипертензия и ХБП являются взаимосвязанными заболеваниями [20], однако вопрос о влиянии ХБП на сократительную активность кровеносных сосудов при наличии гипертонической болезни иной этиологии остается практически не изученным. Нам удалось обнаружить только одну работу по выяснению действия нефрэктомии на реактивность артерий спонтанно гипертензивных крыс [21].

Исходя из имеющихся данных о том, что нефрэктомия, являющаяся общепризнанной моделью ХБП [22–24], может приводить к повышению изначально нормального артериального давления, предположительно, за счет обнаруженного снижения дилататорной [10, 11, 22–25] и увеличения констрикторной [22, 24, 26] способности кровеносных сосудов, в качестве рабочей гипотезы для нашего исследования выступало предположение о том, что ХБП может вызывать аналогичные изменения и при наличии гипертонической болезни иной этиологии. Учитывая все сказанное выше, мы провели данное исследование, целью которого являлось изучение влияния нефрэктомии на реактивность артерий спонтанно гипертензивных крыс и выяснение возможных механизмов этого влияния.

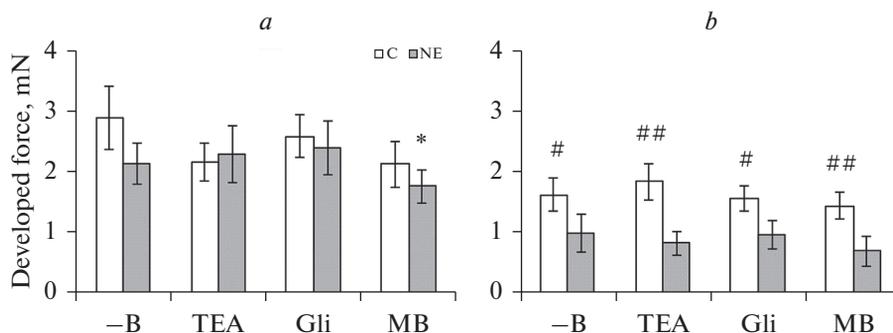
В качестве объектов исследования были взяты: передняя брыжечная артерия (ПБА), часто используемая при изучении влияния нефрэктомии на реактивность кровеносных сосудов [25, 27, 28], и внутренняя сонная артерия (ВСА), которая, будучи парной, обеспечивает большую часть мозгового кровотока у человека и крысы [29], а, как известно, нарушение этого кровотока является частой причиной инсультов при гипертонии разной этиологии [30].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на животных из ЦКП Биокolleкция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной Программой по сохранению и развитию биоресурсных коллекций России.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Опыты проводили на самцах крыс линии SHR через 3 месяца после нефрэктомии ( $n = 9$ , артериальное давление (АД)  $238 \pm 2$  мм рт. ст.) и ложнооперированных контрольных ( $n = 11$ , АД  $190 \pm 2$  мм рт. ст.,  $p < 0.001$ ) животных массой 250–350 г. АД измеряли на хвосте манжеточным методом с помощью электроманометра фирмы ELEMA (Швеция). ХБП моделировали путем резекции 5/6 массы почечной ткани у крыс в возрасте 3 месяца по описанной ранее методике [25], в результате использования которой через 4 месяца после операции содержание мочевины в сыворотке крови крыс увеличивалось в среднем с  $4.9 \pm 0.6$  до  $20.1 \pm 2.6$  ммоль/л ( $p < 0.001$ ) [25]. Контролем служили ложнооперированные крысы, которые подвергались аналогичному оперативному вмешательству, но без удаления почечной ткани. Эвтаназию животных осуществляли посредством эфирного наркоза.

После эвтаназии отпрепаровывали левую ВСА, а затем ПБА. От каждой из этих артерий отрезали кольцевой участок длиной 2 мм, который надевали на две вольфрамовые иголочки (диаметром 70 мкм каждая), одна из которых была соединена со штоком погружателя микроэлектродов, а вторая – с механотроном 6MX1C, сигнал от которого, отражающий изменение натяжения в стенке сегмента, усиливался и поступал на АЦП S-Recorder-L (ADSlab, Россия), а далее на персональный компьютер для обработки в программе S-Recorder (ADSlab, Россия). Иголочки с кольцевым участком помещали в проточную термостатируемую ( $37^\circ\text{C}$ ) ванночку объемом 10 мл, заполненную бикарбонатным раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 115, KCl – 4.7, CaCl<sub>2</sub> – 2.6, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 1.2, NaHCO<sub>3</sub> – 25, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.2, глюкоза – 10. pH раствора доводили до значения 7.4 и контролировали в течение всего эксперимента, поддерживая это значение путем пропускания через раствор соответствующего количества CO<sub>2</sub> или комнатного воздуха. После погружения препарата в раствор, иголочки миографа ступенчато разводили до значения натяжения, при котором наблюдался максимальный ответ сосудистого сегмента на стимуляцию электрическим полем (30 В, 3 мс) с частотой 10 Гц в течение 3 с. Электростимуляция осуществлялась с помощью двух платиновых электродов, расположенных на расстоянии 2 мм от сосудистого сегмента. После адаптации препарата, продолжавшейся 30 мин, начинали регистрацию натяжения стенки сосуда. Для оценки дилататорной способности сосуда использовали ацетилхолин хлорид (Sigma-Aldrich, США)  $10^{-5}$  М или нитропруссид натрия (ICN Biomedicals, США)  $10^{-6}$  М на фоне пресокращения фенилэфрином (Sigma-Aldrich, США)  $10^{-5}$  М. Дилатацию выражали в процентном отношении к констрикции, вызванной фенилэфрином. С целью оценки участия Ca<sup>2+</sup>-активируемых K<sup>+</sup>-каналов большой проводимости, АТФ-чувствительных K<sup>+</sup>-каналов и растворимой гуанилатциклазы в сосудистых реакциях в ванночку вводили соответствующие блокаторы: тетраэтил-аммоний хлорид (Вектон, Россия)  $10^{-3}$  М, глибенкламид (Sigma-Aldrich, США)  $10^{-5}$  М или ингибитор растворимой гуанилатциклазы – метиленовый синий (Вектон, Россия)  $10^{-5}$  М. Через 15 мин после введения блокатора или ингибитора в ванночку вводили фенилэфрин с последующим добавлением ацетилхолина и нитропруссид натрия. Глибенкламид растворяли в диметилсульфоксиде (Вектон, Россия), широко применяемом для этой цели в экспериментах на изолированных сосудах [31]. Концентрация диметилсульфоксида в ванночке с сосудистым сегментом не превышала 0.1%. Маточные растворы остальных используемых веществ готовили на основе дистиллированной воды.



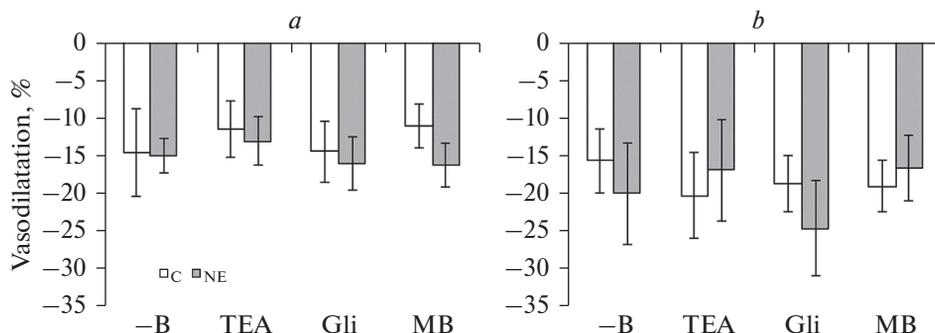
**Рис. 1.** Сократительная реакция на фенилэфрин ( $10^{-5}$  M) сегмента верхней брыжеечной (a) и внутренней сонной (b) артерии контрольных (C) и нефрэктомированных (NE) крыс при отсутствии блокаторов и ингибитора (-B) в ванночке, а также при наличии в ней тетраэтиламмония (TEA,  $10^{-3}$  M), глибенкламида (Gli,  $10^{-5}$  M) или метиленового синего (MB,  $10^{-5}$  M). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \*  $p < 0.05$  при сравнении с -B соответствующей группы; #  $p < 0.05$  и ##  $p < 0.005$  при сравнении с NE.

При статистической обработке результатов использовали программы IBM SPSS Statistics v. 26 и Statistica v. 12. Оценку нормальности распределения выборок проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics v. 26, используя критерии Пирсона и Колмогорова–Смирнова. Вследствие нормальности распределения полученных данные представляли в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверность отличий реакций сосудов нефрэктомированных и контрольных крыс в отсутствие и на фоне действия блокаторов  $K^+$ -каналов и ингибитора гуанилатциклазы определяли, применяя двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони при последующем post-hoc анализе. Для сравнения двух выборок использовали  $t$ -критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах на ПБА контрольных и нефрэктомированных крыс введение фенилэфрина вызвало сократительную реакцию, которая в среднем составляла  $2.9 \pm 0.5$  и  $2.1 \pm 0.3$  мН ( $p > 0.05$ ) соответственно. Какого-либо действия блокаторов  $K^+$ -каналов на эту реакцию у крыс обеих групп обнаружено не было, в то время как ингибитор гуанилатциклазы статистически достоверно снижал величину сокращения ПБА нефрэктомированных животных (рис. 1a). Величина сократительной реакции ВСА контрольных и нефрэктомированных крыс была существенно меньше, чем у ПБА и составляла в среднем  $1.6 \pm 0.3$  и  $1.0 \pm 0.3$  мН соответственно. Под действием блокаторов  $K^+$ -каналов и ингибитора гуанилатциклазы на эту артерию у крыс обеих групп не происходило изменения величины данной реакции относительно исходных значений. Нефрэктомия привела к достоверному и значительному снижению сократительного ответа ВСА на фенилэфрин как в отсутствие, так и при наличии блокаторов и ингибитора (рис. 1b).

Артерии, пресокращенные фенилэфрином, в подавляющем большинстве случаев реагировали на введение ацетилхолина двухфазной реакцией, дилататорная фаза которой у контрольных и нефрэктомированных крыс для ПБА составляла  $14.7 \pm 5.8$  и  $15.0 \pm 2.3\%$ , а для ВСА  $16.1 \pm 4.2$  и  $20.5 \pm 6.8\%$  соответственно. В результате действия блокаторов  $K^+$ -каналов и ингибитора гуанилатциклазы не происходило из-



**Рис. 2.** Дилататорная фаза реакции на ацетилхолин ( $10^{-5}$  М) пресокращенного фенилэфрином ( $10^{-5}$  М) сегмента верхней брыжеечной (а) и внутренней сонной (б) артерии контрольных (С) и нефрэктомированных (NE) крыс при отсутствии блокаторов и ингибитора (–В) в ванночке, а также при наличии в ней тетраэтиламмония (TEA,  $10^{-3}$  М), глибенкламида (Gli,  $10^{-5}$  М) или метиленового синего (MB,  $10^{-5}$  М). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

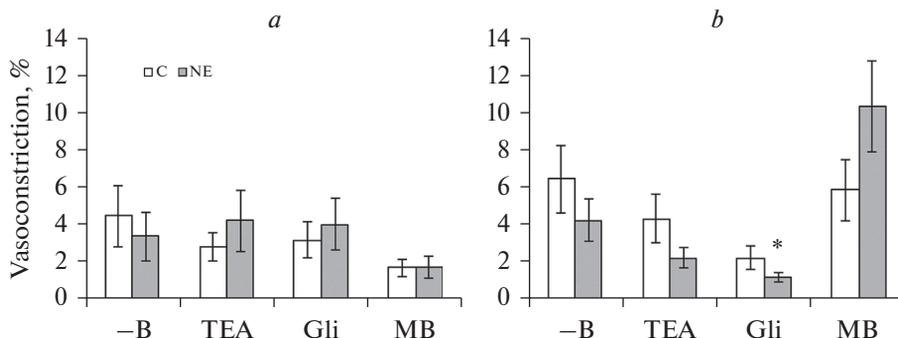
менения дилататорной фазы реакции обоих сосудов контрольных и нефрэктомированных крыс относительно исходных значений (рис. 2а, б). Влияния нефрэктомии на эту фазу реакции не было обнаружено ни при отсутствии, ни на фоне действия блокаторов и ингибитора.

Констрикторная фаза реакции на ацетилхолин ПБА контрольных и нефрэктомированных крыс составляла  $4.4 \pm 1.6$  и  $3.4 \pm 1.3\%$  соответственно и не изменялась на фоне действия блокаторов и ингибитора (рис. 3а). Вызванная ацетилхолином сократительная реакция ВСА контрольных и нефрэктомированных крыс в условиях отсутствия блокаторов  $K^+$ -каналов и ингибитора гуанилатциклазы была равна  $6.5 \pm 1.8$  и  $4.3 \pm 1.1\%$  соответственно и достоверно снижалась только на фоне действия глибенкламида и только у нефрэктомированных крыс (рис. 3б).

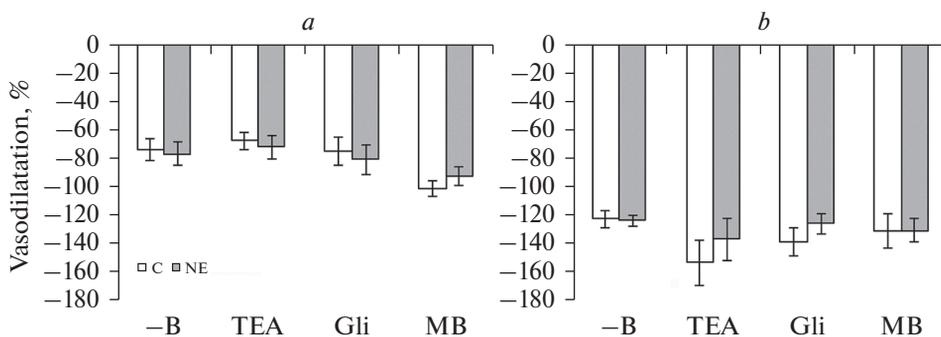
Дилататорная реакция контрольных и нефрэктомированных крыс, вызванная нитропруссидом натрия, в условиях отсутствия блокаторов  $K^+$ -каналов и ингибитора гуанилатциклазы была примерно одинаковой, составляя у ПБА  $74.7 \pm 7.7$  и  $77.3 \pm 7.9\%$ , а у ВСА  $121.1 \pm 6.2$  и  $122.1 \pm 3.6\%$  соответственно, и достоверно не изменялась на фоне их действия у обеих артерий (рис. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе было показано, что нефрэктомия вызывает значительное повышение артериального давления у спонтанно гипертензивных крыс. Повышение артериального давления было отмечено ранее после нефрэктомии в опытах на нормотензивных крысах линии Wistar [32] и Sprague-Dawley [28], а также при ХБП у человека [33]. Однако отмеченное нами повышение давления не было связано с увеличением сократительной способности артерий, имевшим место, например, у спонтанно гипертензивных крыс по сравнению с нормотензивными [15]. В нашей работе было показано, что нефрэктомия, напротив, уменьшает сократительную реакцию, в частности, на фенилэфрин, что проявлялось в небольшой степени у ПБА и в значительной у ВСА. Изменение реактивности кровеносных сосудов при ХБП у человека и после нефрэктомии у животных было отмечено многими исследователями [8, 10, 23, 27]. Следует заметить, что это изменение может быть разным у разных сосудов, а также у одних и тех же сосудов животных разных генетических ли-



**Рис. 3.** Сократительная фаза реакции на ацетилхолин ( $10^{-5}$  M) пресокращенного фенилэфрином ( $10^{-5}$  M) сегмента верхней брыжеечной (a) и внутренней сонной (b) артерии контрольных (C) и нефрэктомированных (NE) крыс при отсутствии блокаторов и ингибитора (-B) в ванночке, а также при наличии в ней тетраэтиламмония (TEA,  $10^{-3}$  M), глибенкламида (Gli,  $10^{-5}$  M) или метиленового синего (MB,  $10^{-5}$  M). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* $p < 0.05$  при сравнении с -B соответствующей группы.



**Рис. 4.** Дилататорная реакция на нитропруссид натрия ( $10^{-6}$  M) пресокращенного фенилэфрином ( $10^{-5}$  M) сегмента верхней брыжеечной (a) и внутренней сонной (b) артерии контрольных (C) и нефрэктомированных (NE) крыс при отсутствии блокаторов и ингибитора (-B) в ванночке, а также при наличии в ней тетраэтиламмония (TEA,  $10^{-3}$  M), глибенкламида (Gli,  $10^{-5}$  M) или метиленового синего (MB,  $10^{-5}$  M). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

ний. Например, в опытах на хвостовой артерии и аорте крысы [22] нефрэктомия приводила к возрастанию величины сократительного ответа на фенилэфрин на аорте и к снижению на хвостовой артерии. В нашей предыдущей работе на крысах линии WKY [26] нефрэктомия вызывала увеличение реакции на фенилэфрин у ПБА и не изменяла ее у ВСА. Причиной отличия новых результатов от полученных нами ранее, может являться как отличие генетических линий животных, так и значительное возрастание АД после нефрэктомии в этой серии опытов (с  $190 \pm 2$  до  $238 \pm 2$  мм рт. ст.) в отличие от предыдущей (с  $127.1 \pm 1.8$  до  $127.2 \pm 2.2$  мм рт. ст.). Отсутствие большего сокращения ПБА на фенилэфрин в концентрации  $10^{-5}$  M при высоком АД (у крыс SHR по сравнению с WKY) было отмечено в работах других авторов [34, 35]. Полученные нами результаты согласуются с данными о сни-

жении сократительной реакции на фенилэфрин после нефрэктомии, полученных на хвостовой артерии [22, 36] и на аорте крысы [32]. Причем в опытах на аорте крысы была отмечена отрицательная корреляция между величиной максимальной реакции на фенилэфрин и артериальным давлением [32].

В нашей работе на спонтанно гипертензивных крысах величина дилататорной реакции артерий на ацетилхолин была значительно меньше величины, полученной нами ранее на крысах линии WKY [26]. Такое снижение эндотелий-зависимой дилатации при гипертонии было отмечено многими авторами, в частности, на общей сонной [37] и брыжеечной артерии крысы [17, 38–40] вплоть до полного исчезновения этой реакции [38, 40]. Нами не было отмечено какого-либо действия нефрэктомии на эндотелий-зависимую дилатацию, вызванную ацетилхолином, ни на ПБА, ни на ВСА спонтанно гипертензивных крыс. Аналогичные результаты были получены ранее на хвостовой артерии [22] и на ПБА крыс линии Sprague-Dawley другими авторами [28], а также нами на ПБА крыс линии WKY [26]. Следует заметить, что в единственной обнаруженной нами работе по выяснению действия нефрэктомии на реактивность артерий спонтанно гипертензивных крыс [21] также не наблюдалось изменения дилататорной реакции на ацетилхолин. Однако на крысах других линий в ряде работ было показано снижение эндотелий-зависимой дилатации после нефрэктомии. В частности, такое снижение было отмечено на аорте [10, 23, 25] и общей сонной артерии крысы [11]. В исследовании, проведенном на ПБА крыс линии Wistar [25], нефрэктомия, в отличие от нашего исследования, приводила к уменьшению расслабления этой артерии, вызванного ацетилхолином, что может объясняться генетическими различиями животных. Как было показано в опытах на брыжеечной артерии мыши [28], эти различия могут являться причиной различного влияния нефрэктомии на эндотелий-зависимую дилатацию кровеносных сосудов.

С целью оценки участия  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов большой проводимости, АТФ-чувствительных  $\text{K}^+$ -каналов и растворимой гуанилатциклазы в сосудодвигательных реакциях ПБА и ВСА мы использовали соответствующие блокаторы – тетраэтиламмоний и глибенкламид, а также и ингибитор растворимой гуанилатциклазы – метиленовый синий. В нашей работе было показано отсутствие влияния этих веществ на вызванную ацетилхолином дилатацию ПБА и ВСА контрольных и нефрэктомированных крыс, что согласуется с данными, полученными на ПБА крыс линии SHR при использовании тетраэтиламмония [17, 39], глибенкламида [38, 40] и метиленового синего [38, 39]. Причиной такого отсутствия действия блокаторов  $\text{K}^+$ -каналов и ингибитора гуанилатциклазы могло являться компенсирование блокады одного сигнального пути активацией другого. В частности, на ПБА было показано, что ибериотоксин (блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов большой проводимости –  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ), сам по себе не оказывающий влияния на вызванную ацетилхолином дилатацию, в сочетании с апамином (блокатор  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ ) и TRAM-34 (блокатор  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ) начинал действовать [38].

В подавляющем большинстве случаев в наших опытах отмечалась не только дилататорная, но и констрикторная реакция ПБА и ВСА на ацетилхолин. Вызванное ацетилхолином сокращение кровеносных сосудов крыс линии SHR было продемонстрировано, в частности, на общей сонной артерии [18]. В опытах на разных кровеносных сосудах других линий крыс было показано, что вызванная ацетилхолином эндотелий-зависимая вазоконстрикция обусловлена стимуляцией мускариновых рецепторов эндотелия [41, 42], связана с синтезом простагландинов [41–44] и опосредована ваниллоидными рецепторами TRPV4 эндотелия [43]. Сократительная реакция в наших опытах на ПБА контрольных и нефрэктомированных крыс под действием блокаторов  $\text{K}^+$ -каналов и ингибитора гуанилатциклазы не изменя-

лась, в то время как на ВСА было обнаружено значительное угнетение этой реакции у нефрэктомированных крыс под действием глибенкламида, что может свидетельствовать об участии АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов в эндотелий-зависимой констрикции этих сосудов после нефрэктомии.

Влияния нефрэктомии на эндотелий-независимую дилатацию, вызванную нитропруссидом натрия, нами не было обнаружено ни на ПБА, ни на ВСА. В большинстве исследований на крысах других линий влияния нефрэктомии на вызодилатацию, вызванную нитропруссидом натрия, также не наблюдалось. В частности, оно не отмечалось на брыжеечной [28], сонной артерии [11, 12], использовавшихся в наших опытах. Не было также обнаружено изменения этой реакции общей сонной [45, 46] и брыжеечной артерии [39, 47] крыс линии SHR по сравнению с крысами WKY. В наших экспериментах блокаторы  $K^+$ -каналов и ингибитор гуанилатциклазы не оказывали действия на эндотелий-независимую дилатацию ПБА и ВСА. Отсутствие уменьшения этой реакции на фоне действия глибенкламида и тетраэтиламмония было показано и другими авторами [31].

Обнаруженные нами различия действия нефрэктомии на сократительные свойства ПБА и ВСА могут быть связаны, в частности, с тем, что у этих артерий, различающихся строением стенки (в которой у ПБА в отличие от ВСА преобладают гладкомышечные клетки), различаются сигнальные пути, участвующие в эндотелий-зависимой и эндотелий-независимой констрикции. Например, было показано, что в условиях блокады эпителиальных  $Na^+$ -каналов усиление потока в брыжеечной артерии вызывает эндотелий-зависимую констрикцию, а в сонной артерии увеличивается эндотелий-зависимая дилатация [48]. Различие сигнальных путей кровеносных сосудов, различающихся строением стенки, было обнаружено также для аорты и хвостовой артерии крысы после нефрэктомии [22].

Итак, в нашем исследовании впервые было изучено влияние нефрэктомии на констрикторные реакции артерий спонтанно гипертензивных крыс и показано, что нефрэктомия вызывает повышение артериального давления у этих животных, которое не было обусловлено предполагавшимся увеличением сократительной способности артерий. Обнаружено существенное уменьшение констрикторных реакций артерий, в значительно большей степени выраженное у ВСА, чем у ВБА. Можно предположить, что существенное снижение сократительной способности ВСА после нефрэктомии у спонтанно гипертензивных крыс в условиях чрезвычайно высокого АД ( $238 \pm 2$  мм рт. ст.), вызванного нефрэктомией, может приводить к опасному возрастанию АД в расположенных дистальнее ВСА сосудах головного мозга, способствуя возникновению в нем инсульта. Кроме того, нами было обнаружено, что уменьшение сократительной реакции изученных артерий связано с изменением активности АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов у ВСА и гуанилатциклазы у ВБА. Полученные данные позволяют предположить, что хроническая болезнь почек при наличии гипертонической болезни иной этиологии может приводить к снижению сократительной способности артерий, способствуя, в частности, возникновению инсульта. Описанные нами изменения сократимости, а также сигнальных механизмов вазоконстрикции, отличающиеся у брыжеечной и сонной артерий, могут учитываться при лечении ХБП.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-015-00047).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, Zhao MH, Lv J., Garg AX, Knight J, Rodgers A, Gallagher M, Kotwal S, Cass A, Perkovic V* (2015) Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet* 385(9981): 1975–1982.  
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)61601-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)61601-9)
2. *Tanaka K, Watanabe T, Takeuchi A, Ohashi Y, Nitta K, Akizawa T, Matsuo S, Imai E, Makino H, Hishida A* (2017) Cardiovascular events and death in Japanese patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 91(1): 227–234.  
<https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.015>
3. *Vallianou NG, Mitesh S, Gkogkou A, Geladari E* (2019) Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Is there Any Relationship? *Curr Cardiol Rev* 15(1): 55–63.  
<https://doi.org/10.2174/1573403x14666180711124825>
4. *Fujii H, Kono K, Nishi S* (2019) Characteristics of coronary artery disease in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 23(6): 725–732.  
<https://doi.org/10.1007/s10157-019-01718-5>
5. *Bai Y, Zhang J, Xu J, Cui L, Zhang H, Zhang S* (2015) Alteration of type I collagen in the radial artery of patients with end-stage renal disease. *Am J Med Sci* 349(4): 292–297.  
<https://doi.org/10.1097/maj.0000000000000408>
6. *Kuranov G, Nikolaeva A, Frank-Kamenetskaya O, Gulyaev N, Volina O* (2019) Physicochemical characterization of human cardiovascular deposits. *J Biol Inorg Chem* 24(7): 1047–1055.  
<https://doi.org/10.1007/s00775-019-01714-w>
7. *Malyszko J* (2010) Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta* 411(19–20): 1412–1420.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.06.019>
8. *Kopel T, Kaufman JS, Hamburg N, Sampalis JS, Vita JA, Dember LM* (2017) Endothelium-Dependent and -Independent Vascular Function in Advanced Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 12(10): 1588–1594.  
<https://doi.org/10.2215/cjn.12811216>
9. *Keskin GS, Helvacı Ö, Yayla Ç, Paşaoğlu Ö, Keskin Ç, Arınsoy T, Derici Ü* (2019) Relationship between plasma YKL-40 levels and endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Turk J Med Sci* 49(1): 139–146.  
<https://doi.org/10.3906/sag-1804-169>
10. *Li T, Gua C, Wu B, Chen Y* (2018) Increased circulating trimethylamine N-oxide contributes to endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* 495(2): 2071–2077.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.069>
11. *Köhler R, Eichler I, Schönfelder H, Grgic I, Heinau P, Si H, Hoyer J* (2005) Impaired EDHF-mediated vasodilation and function of endothelial Ca-activated K channels in uremic rats. *Kidney Int* 67(6): 2280–2287.  
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00331.x>
12. *Moroe H, Honda H* (2006) Comparison of endothelial function in the carotid artery between normal and short-term hypercholesterolemic rabbits. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 144(2): 197–203.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.011>
13. *Poulter NR, Prabhakaran D, Caulfield M* (2015) Hypertension. *Lancet* 386(9995): 801–812.  
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)61468-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)61468-9)
14. *Campbell NR, Lackland DT, Lisheng L, Niebylski ML, Nilsson PM, Zhang XH* (2015) Using the Global Burden of Disease study to assist development of nation-specific fact sheets to promote prevention and control of hypertension and reduction in dietary salt: a resource from the World Hypertension League. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 17(3): 165–167.  
<https://doi.org/10.1111/jch.12479>
15. *Brown IAM, Diederich L, Good ME, DeLalio LJ, Murphy SA, Cortese-Krott MM, Hall JL, Le TH, Isakson BE* (2018) Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(9): 1969–1985.  
<https://doi.org/10.1161/atvbaha.118.311229>
16. *Lin Q, Zhao G, Fang X, Peng X, Tang H, Wang H, Jing R, Liu J, Lederer WJ, Chen J, Ouyang K* (2016) IP(3) receptors regulate vascular smooth muscle contractility and hypertension. *JCI Insight* 1(17): e89402.  
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.89402>
17. *Sipola M, Finckenberg P, Vapaatalo H, Pihlanto-Leppälä A, Korhonen H, Korpela R, Nurminen ML* (2002) Alpha-lactorphin and beta-lactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 71(11): 1245–1253.  
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)01793-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01793-9)
18. *Denniss SG, Ford RJ, Smith CS, Jeffery AJ, Rush JW* (2016) Chronic in vivo or acute in vitro resveratrol attenuates endothelium-dependent cyclooxygenase-mediated contractile signaling in

- hypertensive rat carotid artery. *J Appl Physiol* (1985) 120(10): 1141–1150.  
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00675.2015>
19. *Lan C, Chen X, Zhang Y, Wang W, Wang WE, Liu Y, Cai Y, Ren H, Zheng S, Zhou L, Zeng C.* (2018) Curcumin prevents strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats by improving vascular endothelial function. *BMC Cardiovasc Disord* 18(1): 43.  
<https://doi.org/10.1186/s12872-018-0768-6>
  20. *Ku E, Lee BJ, Wei J, Weir MR* (2019) Hypertension in CKD: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis* 74(1): 120–131.  
<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.12.044>
  21. *Thuraisingham RC, Raine AE* (1999) Maintenance of normal agonist-induced endothelium-dependent relaxation in uraemic and hypertensive resistance vessels. *Nephrol Dial Transplant* 14(1): 70–75.  
<https://doi.org/10.1093/ndt/14.1.70>
  22. *Spradley FT, White JJ, Paulson WD, Pollock DM, Pollock JS* (2013) Differential regulation of nitric oxide synthase function in aorta and tail artery from 5/6 nephrectomized rats. *Physiol Rep* 1(6): e00145.  
<https://doi.org/10.1002/phy2.145>
  23. *Zanetti M, Gortan Cappellari G, Barbetta D, Semolic A, Barazzoni R* (2017) Omega 3 Polyunsaturated Fatty Acids Improve Endothelial Dysfunction in Chronic Renal Failure: Role of eNOS Activation and of Oxidative Stress. *Nutrients* 9(8).  
<https://doi.org/10.3390/nu9080895>
  24. *Li T, Gua C, Wu B, Chen Y* (2018) Increased circulating trimethylamine N-oxide contributes to endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* 495(2): 2071–2077.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.069>
  25. *Иванова ГТ, Лобов ГИ, Береснева ОН, Парастаева ММ* (2019) Изменение реактивности сосудов крыс с экспериментальным уменьшением массы функционирующих нефронов. *Нефрология* 23(4): 88–95. [*Ivanova GT, Lobov GI, Beresneva ON, Parastaeva MM* (2019) Changes in the reactivity of vessels of rats with an experimental decrease in the mass of functioning nephrons. *Nephrology* 23(4): 88–95. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.24884/1561-6274-2019-23-4-88-95>
  26. *Ярцев ВН, Иванова ГТ, Лобов ГИ* (2020) Влияние нефрэктомии на реактивность артерий крыс линии Wistar-Kyoto. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 106(12): 1553–1563. [*Yartsev VN, Ivanova G., Lobov GI* (2020) Effect of Nephrectomy on the Reactivity of Arteries from the Wistar-Kyoto Rats. *Russ J Physiol* 106(12): 1553–1563. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S0869813920120092>
  27. *Hamzaoui M, Djerada Z, Brunel V, Mulder P, Richard V, Bellien J, Guerrot D* (2020) 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6J mice. *Sci Rep* 10(1): 1524.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58393-w>
  28. *Nguy L, Nilsson H, Lundgren J, Johansson ME, Teerlink T, Scheffer PG, Guron G* (2012) Vascular function in rats with adenine-induced chronic renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302(12): R1426–R1435.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00696.2011>
  29. *Roloff EV, Tomiak-Baquero AM, Kasparov S, Paton JF* (2016) Parasympathetic innervation of vertebrobasilar arteries: is this a potential clinical target? *J Physiol* 594(22): 6463–6485.  
<https://doi.org/10.1113/jp272450>
  30. *Cipolla MJ, Liebeskind DS, Chan SL* (2018) The importance of comorbidities in ischemic stroke: Impact of hypertension on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 38(12): 2129–2149.  
<https://doi.org/10.1177/0271678x18800589>
  31. *Ohashi M, Faraci F, Heistad D* (2005) Peroxynitrite hyperpolarizes smooth muscle and relaxes internal carotid artery in rabbit via ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(5): H2244–H2250.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00254.2005>
  32. *Ulu N, Mulder GM, Vavrinc P, Landheer S, Duman-Dalkilic B, Gurdal H, Goris M, Duin M, van Dokkum RP, Buikema H, van Goor H, Henning RH* (2013) Epidermal growth factor receptor inhibitor PKI-166 governs cardiovascular protection without beneficial effects on the kidney in hypertensive 5/6 nephrectomized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 345(3): 393–403.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.113.203497>
  33. *Cruz-Domínguez MP, Villalobos-Molina R, Miliar-García A, Montes-Cortés DH, Reséndiz-Ramírez AC, Asbun-Bojalil J, Cervantes-Cruz J, Castillo-Hernández MC, Castillo-Henkel C* (2008) Evidence of alpha1-adrenoceptor functional changes in omental arteries of patients with end-stage renal disease. *Auton Autacoid Pharmacol* 28(1): 19–27.  
<https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.2007.00413.x>

34. *Albarwani S, Al-Siyabi S, Al-Husseini I, Al-Ismail A, Al-Lawati I, Al-Bahrani I, Tanira MO* (2015) Lisinopril alters contribution of nitric oxide and K(Ca) channels to vasodilatation in small mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res* 64(1): 39–49. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932780>
35. *Carvalho-Galvão A, Ogunlade B, Xu J, Silva-Alves CRA, Mendes-Júnior LG, Guimarães DD, Cruz JC, Queiroz TM, Balarini CM, Braga VA, Filipeanu CM, Lazartigues E, de França-Silva MDS* (2018) Central administration of TRV027 improves baroreflex sensitivity and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* 132(14): 1513–1527. <https://doi.org/10.1042/cs20180222>
36. *Brymora A, Flisiński M, Grześk G, Szadujkis-Szadurski L, Odrowaz-Sypniewska G, Manitius J* (2007) Inflammation, malnutrition and vascular contraction in experimental chronic kidney disease. *J Nephrol* 20(4): 423–429.
37. *Lan C, Chen X, Zhang Y, Wang W, Wang WE, Liu Y, Cai Y, Ren H, Zheng S, Zhou L, Zeng C* (2018) Curcumin prevents strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats by improving vascular endothelial function. *BMC Cardiovasc Disord* 18(1): 43. <https://doi.org/10.1186/s12872-018-0768-6>
38. *Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M* (1992) Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 70(4): 660–669. <https://doi.org/10.1161/01.res.70.4.660>
39. *Young RH, Ding YA, Lee YM, Yen M* (1995) Cilazapril reverses endothelium-dependent vasodilator response to acetylcholine in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 8(9): 928–933. [https://doi.org/10.1016/0895-7061\(95\)00158-1](https://doi.org/10.1016/0895-7061(95)00158-1)
40. *Sunano S, Watanabe H, Tanaka S, Sekiguchi F, Shimamura K* (1999) Endothelium-derived relaxing, contracting and hyperpolarizing factors of mesenteric arteries of hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 126(3): 709–716. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702355>
41. *Baretella O, Xu A, Vanhoutte PM* (2014) Acidosis prevents and alkalosis augments endothelium-dependent contractions in mouse arteries. *Pflugers Arch* 466(2): 295–305. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1323-z>
42. *Giang M, Papamatheakis DG, Nguyen D, Paez R, Blum Johnston C, Kim J, Brunnell A, Blood Q, Goyal R, Longo LD, Wilson SM* (2016) Muscarinic Receptor Activation Affects Pulmonary Artery Contractility in Sheep: The Impact of Maturation and Chronic Hypoxia on Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Function. *High Alt Med Biol* 17(2): 122–132. <https://doi.org/10.1089/ham.2015.0116>
43. *Zhang P, Sun C, Li H, Tang C, Kan H, Yang Z, Mao A, Ma X* (2018) TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) Mediates Endothelium-Dependent Contractions in the Aortas of Hypertensive Mice. *Hypertension* 71(1): 134–142. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.117.09767>
44. *Лобов ГИ, Соколова ИБ* (2020) Роль NO и H<sub>2</sub>S в регуляции тонуса церебральных сосудов при хронической болезни почек. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 106(8): 1002–1015. [*Lobov GI, Sokolova IB* (2020) Role of NO and H<sub>2</sub>S in the regulation of the tone of cerebral vessels in chronic kidney disease. *Russ J Physiol* 106(8): 1002–1015. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813920080063>
45. *Chen Hi HI, Chiang IP, Jen C.* (1996) Exercise Training Increases Acetylcholine-Stimulated Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Biomed Sci* 3(6): 454–460. <https://doi.org/10.1007/bf02258049>
46. *Denniss SG, Ford RJ, Smith CS, Jeffery AJ, Rush JW* (2016) Chronic in vivo or acute in vitro resveratrol attenuates endothelium-dependent cyclooxygenase-mediated contractile signaling in hypertensive rat carotid artery. *J Appl Physiol* (1985) 120(10): 1141–1150. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00675.2015>
47. *Qiu F, Liu X, Zhang Y, Wu Y, Xiao D, Shi L* (2018) Aerobic exercise enhanced endothelium-dependent vasorelaxation in mesenteric arteries in spontaneously hypertensive rats: the role of melatonin. *Hypertens Res* 41(9): 718–729. <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0066-9>
48. *Ashley Z, Mugloo S, McDonald FJ, Fronius M* (2018) Epithelial Na<sup>+</sup> channel differentially contributes to shear stress-mediated vascular responsiveness in carotid and mesenteric arteries from mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 314(5): H1022–H1032. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00506.2017>

---

### Effect of Nephrectomy on the Reactivity of Arteries from the Spontaneously Hypertensive Rats

V. N. Yartsev\*

*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Acad. Sci., St. Petersburg, Russia*

*\*e-mail: yartsev@infran.ru.*

The effect of nephrectomy on the SHR rat superior mesenteric artery (SMA) and internal carotid artery (ICA) segments constriction and dilatation ability was studied under isometric conditions using myograph. 5/6 nephrectomy (5/6 Nx) in the rats 3 months old was used as a model of the chronic kidney disease. Dilatation of the phenylephrine-precontracted segments was induced by acetylcholine (ACh) or sodium nitroprusside (SNP) in the absence and presence of potassium channels blockers (tetraethylammonium, glibenclamide) or methylene blue, a guanylyl-cyclase inhibitor. The phenylephrine-induced contraction was slightly reduced in the SMA from 5/6 Nx rats relative to the control ones and significantly decreased in the presence of methylene blue. This reaction in the ICA from 5/6 Nx rats was significantly less than in the control ones, both in the absence and in the presence of the blockers and the inhibitor. The effect of nephrectomy on the dilatatory reaction of both arteries caused by ACh or SNP was not found, but the constrictor reaction of ICA to ACh in the presence of glibenclamide significantly decreased in 5/6 Nx, but not in control rats. We conclude that the chronic kidney disease may weaken endothelium dependent and independent vasoconstriction in the ICA from SHR rats, as well as differently change the signaling pathways of this reaction in different types of arteries.

*Keywords:* acetylcholine, internal carotid artery, superior mesenteric artery, SHR, nephrectomy, phenylephrine

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

ИЗМЕНЕНИЕ ВКЛАДА  $K_{ATФ}$ -КАНАЛОВ В ПОДДЕРЖАНИЕ  
БАЗАЛЬНОГО ТОНУСА И ДИЛАТАЦИЮ ПИАЛЬНЫХ  
АРТЕРИАЛЬНЫХ СОСУДОВ КРЫС ПОСЛЕ ИШЕМИИ

© 2021 г. О. П. Горшкова<sup>1</sup>, \*, И. Б. Соколова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: o\_gorshkova@inbox.ru

Поступила в редакцию 06.11.2020 г.

После доработки 01.07.2021 г.

Принята к публикации 09.07.2021 г.

Изучалось изменение вклада АТФ-чувствительных калиевых каналов ( $K_{ATФ}$ ) в поддержание базального тонуса и опосредованной ацетилхолином (АХ) дилатации пиальных артериальных сосудов крыс Вистар после перенесенной однократной ишемии/реперфузии коры головного мозга. Ишемию моделировали посредством пережатия обеих сонных артерий с одновременным снижением и строгим поддержанием среднего артериального давления на уровне  $45 \pm 2$  мм рт. ст. на 12 мин. Исследование сосудов проводили через 7, 14 и 21 день после ишемии/реперфузии. С использованием метода прижизненной микрофотосъемки оценивали реакции пиальных артерий у крыс, перенесших ишемию, и у ложнооперированных животных. Об изменении вклада  $K_{ATФ}$ -каналов в поддержание базального тонуса судили по изменению числа сосудов, сузившихся в ответ на воздействие блокатора  $K_{ATФ}$ -каналов (глибенкламид, 10 мкМ). Изменение вклада каналов в дилатацию сосудов оценивали путем сравнения числа и степени дилатации артерий в ответ на действие ацетилхолин хлорида (АХ,  $10^{-7}$  М, 5 мин) до и после применения блокатора  $K_{ATФ}$ -каналов. Установлено, что ишемия/реперфузия приводит к снижению вклада АТФ-чувствительных калиевых каналов в поддержание базального тонуса пиальных артериальных сосудов на протяжении 14 дней после ишемического воздействия. Одновременно с этим снижается роль  $K_{ATФ}$ -каналов в осуществлении АХ-опосредованных дилататорных реакций пиальных сосудов. И к 21-му дню после ишемии  $K_{ATФ}$ -каналы практически не участвуют в осуществлении дилататорного ответа на АХ.

*Ключевые слова:* АТФ-чувствительные калиевые каналы, ишемия головного мозга, пиальные артериальные сосуды

DOI: 10.31857/S0869813921090053

Реперфузия ишемизированной ткани имеет решающее значение для восстановления нормального функционирования пораженного органа, но она также парадоксальным образом может привести к вторичному повреждению. Вопросы взаимосвязи между первичными и повторными ишемическими поражениями головного мозга в настоящее время изучены недостаточно полно. Исход и отдаленные последствия ишемии/реперфузии (И/Р) головного мозга во многом определяются изменениями, происходящими в церебральном сосудистом русле. Важнейшими элементами, обеспечивающими нормальное функционирование сосудистой сети, являются ионные каналы, экспрессируемые как в эндотелиальных, так и в сосуди-

стых гладкомышечных клетках [1–4]. Значительную роль в регуляции тонуса мозговых сосудов играют АТФ-чувствительные калиевые каналы ( $K_{AT\Phi}$ ) [1, 5, 6]. Их активация вызывает гиперполяризацию сосудистых миоцитов и вазодилатацию [3, 7, 8]. Связанное с изменением функционирования  $K_{AT\Phi}$ -каналов постишемическое нарушение дилататорных механизмов сосудов головного мозга может приводить к локальному сужению или закрытию мелких церебральных сосудов и развитию эпизодов повторной очаговой ишемии. Целью данной работы было изучение изменения вклада  $K_{AT\Phi}$ -каналов гладкомышечных клеток церебральных артерий в регуляцию их тонуса на разных сроках постишемического периода. В задачи исследования входило изучение изменения вклада  $K_{AT\Phi}$ -каналов в поддержание базального тонуса и осуществлении опосредованной ацетилхолином (АХ) дилатации пилальных артериальных сосудов у крыс через 7, 14 и 21 день после перенесенной глобальной транзиторной ишемии коры головного мозга.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 4-месячных самцах крыс Вистар ( $n = 74$ ) массой 250–320 г из ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН”. Работа выполнена в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, принятыми Европейской конвенцией 19.07.2014, и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

Ишемия коры головного мозга воспроизводилась с использованием техники окклюзии двух сосудов с управляемой гипотензией, известной в англоязычной литературе как “2-vessel occlusion + hypotention model” [9], с авторскими модификациями. У наркотизированных хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела) крыс производилась 12-минутная окклюзия обеих сонных артерий с одновременной управляемой гипотензией (снижение и строгое поддержание артериального давления (АД) на уровне  $45 \pm 2$  мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови в гепаринизированный шприц). Прямое измерение АД производилось через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур, <https://www.argonmedical.com>), подключенным к АЦП, входящему в состав микроконтроллера фирмы STMicroelectronics (США, <https://www.st.com>), выход которого был подключен к компьютеру через порт USB. Для работы устройства с компьютером в нашей лаборатории была разработана оригинальная программа визуализации значений АД. Расчет среднего АД в реальном времени производился программой по классической формуле:

$$P_{cp} = P_d + 1/3(P_c - P_d),$$

где  $P_{cp}$  – среднее артериальное давление (мм рт. ст.),  $P_c$  – систолическое давление (мм рт. ст.),  $P_d$  – диастолическое давление (мм рт. ст.).

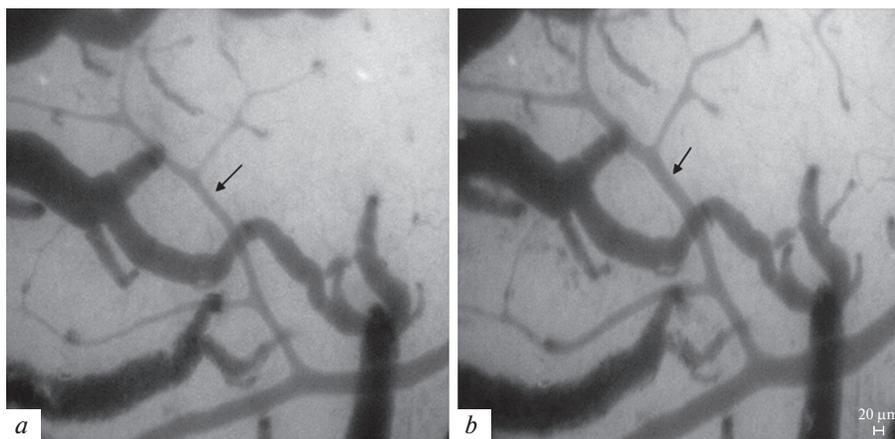
По окончании периода ишемии производилась полная реинфузия забранной крови и ушивание операционных ран. До выхода из наркоза крысы содержались на электрогрелках (S315, EcoSapiens, Россия) при температуре 38°C. После выхода из наркоза животные возвращались в клетки своего обычного содержания.

Постишемические изменения исследовались в отдельных группах крыс: на 7-й, 14-й и 21-й день после ишемии. Контролем служили ложнооперированные животные (ЛО), которые подвергались аналогичному оперативному вмешательству, но без проведения ишемии, через 7, 14 и 21 день после операции соответственно.

Для проведения прижизненного исследования реакций пияльных артерий, крыс наркотизировали зоветилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, Virbac, Франция). В тенной области черепа животного высверливалось отверстие ( $S \approx 1 \text{ см}^2$ ), твердая мозговая оболочка в пределах отверстия удалялась, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошалась раствором Кребса (в мМ: NaCl 120.4; KCl 5.9;  $\text{NaHCO}_3$  15.5;  $\text{MgCl}_2$  1.2;  $\text{CaCl}_2$  2.5;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.2; глюкоза 11.5; pH 7.4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента содержался в медицинском водяном термостате (TW-2, SIA "ELMI", Латвия) при температуре 37°C. На протяжении всего эксперимента контролировали среднее АД, показатели которого в течение всего эксперимента оставались примерно на одном уровне и составляли  $134 \pm 5$  мм рт. ст. Температура тела животного поддерживалась на уровне 38°C. Контроль за ректальной температурой осуществлялся с помощью лабораторного термометра ТТЖ-М, ОАО Стеклоприбор, Украина. Визуализация пияльных артерий проводилась с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (Микромед, Россия), цветную камеру-видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scopetek, Китай) и персональный компьютер.

При проведении эксперимента крысы разделялись на 12 отдельных групп. У первых 6-ти групп: крысы через 7 ( $n = 8$ ), 14 ( $n = 8$ ) и 21 ( $n = 6$ ) день после перенесенной ишемии и ложноперированные крысы через 7 ( $n = 6$ ), 14 ( $n = 5$ ) и 21 ( $n = 6$ ) день после оперативного вмешательства, исследовали реакции сосудов на орошение поверхности головного мозга раствором АХ (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich,  $10^{-7}$  М [10], 8 мин). Исследование проводили в отсутствие и на фоне блокады  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналов глибенкламидом (Glybenclamide, Sigma-Aldrich, 10 мкМ, в растворе диметилсульфоксида (DMSO), предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). Концентрация DMSO в применяемом растворе глибенкламида не превышала 0.1%. Ранее проведенные исследования показали, что DMSO в такой концентрации не оказывает влияние на тонус церебральных артерий [11]. В 6-ти других группах: крысы через 7 ( $n = 6$ ), 14 ( $n = 6$ ) и 21 ( $n = 7$ ) день после перенесенной ишемии и ложноперированные крысы через 7 ( $n = 5$ ), 14 ( $n = 6$ ) и 21 ( $n = 5$ ) день после оперативного вмешательства, исследовали реакции сосудов на воздействие активатора АТФ-чувствительных калиевых каналов – пинацидила (Pinacidil monohydrate, Sigma-Aldrich, 200 мкМ, в растворе DMSO). Для активации каналов поверхность мозга в течение 5 мин предварительно орошали раствором пинацидила. Фоновую реакцию на воздействие АХ в каждой группе анализировали по всему массиву сосудов и принимали за 100%. Проверка по критерию Краскела–Уоллеса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными в фоновых реакциях на воздействие АХ внутри каждой из исследованных групп. Общая продолжительность эксперимента составляла 60–90 мин, после чего животных усыпляли передозировкой раствора зоветила (60 мг/кг).

Диаметр сосудов измеряли на статических изображениях (рис. 1) с помощью компьютерной программы для цитофотометрии "Photo M 1.21" (авторская разработка А. Черниговского, [http://www.t\\_lambda.chat.ru](http://www.t_lambda.chat.ru)), осуществляющей расчет оптической плотности фотографий, определение расстояния между объектами и площади области на фотографии. В программе предусмотрен режим увеличения изображения и калибровки для пересчета всех координат в метрические единицы. С использованием программы, вручную измерялась ширина потока эритроцитов, соответствующая внутреннему диаметру сосуда. Об изменении вклада  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналов в поддержание базального тонуса сосудов судили по изменению числа сосудов, сузившихся в ответ на воздействие блокатора  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -каналов глибенкламида. Изме-



**Рис. 1.** Микрофотографии пиальных сосудов,  $\times 140$ . *a* – исходное состояние; *b* – реакция на орошение поверхности головного мозг раствором АХ ( $10^{-7}$  М, 8 мин). Стрелками указан артериальный участок пиальной сосудистой сети.

нение вклада каналов в дилатации сосудов оценивали путем сравнения числа дилатированных сосудов и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ до и после применения блокатора.

Изменение количества расширившихся и сузившихся сосудов на воздействие выражалось в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Степень дилатации  $\Delta D$  оценивали как разность между значениями диаметра после ( $D_2$ ) и до ( $D_1$ ) воздействия АХ относительно диаметра сосуда  $D_1$  перед воздействием АХ, %:

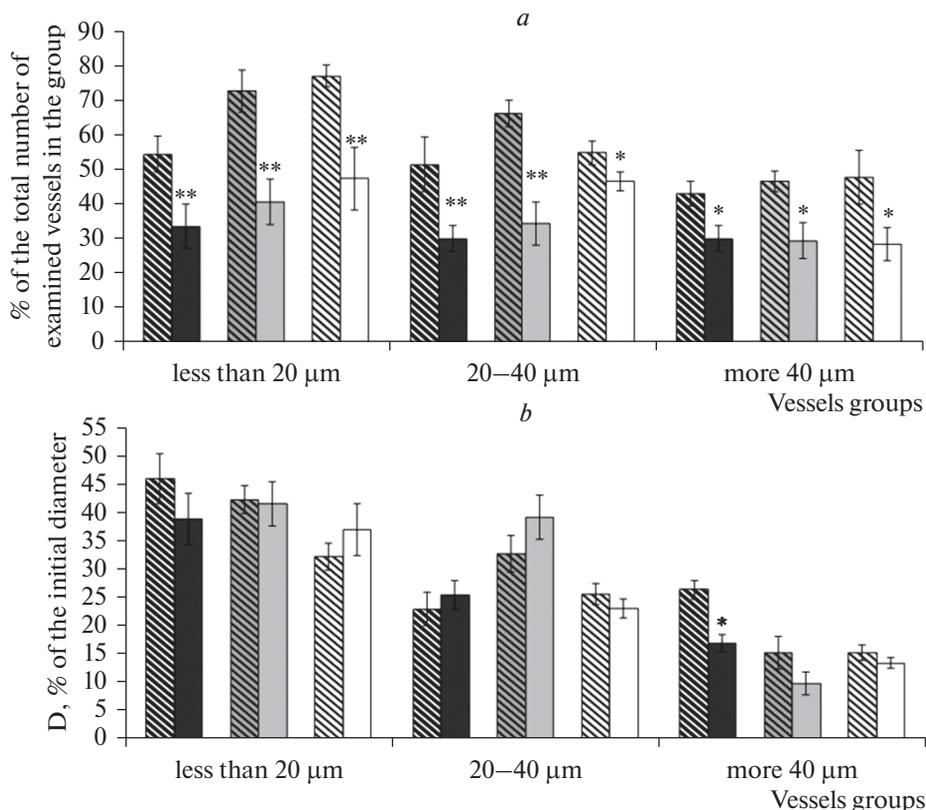
$$\Delta D = (D_2 - D_1) / D_1 \times 100.$$

Изменения диаметра в покое не превышали  $5.0 \pm 0.5\%$ , поэтому при таких значениях считали, что реакция на воздействие отсутствует.

У каждой крысы было измерено от 40 до 60 участков сосудов. Для последующего анализа измеренные сосуды были разделены на группы в соответствии с их диаметрами: мелкие сосуды (диаметром от 9 до 20 мкм), сосуды среднего диаметра (от 20 до 40 мкм) и крупные сосуды (более 40 мкм). Данные по отдельной группе сосудов усреднялись для каждого животного и использовались для статистических сравнений. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Данные представляли в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Применяли *U*-критерий Манна–Уитни (при сравнении 2-х групп) и критерий Краскела–Уоллиса (при сравнении более 2-х групп). Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

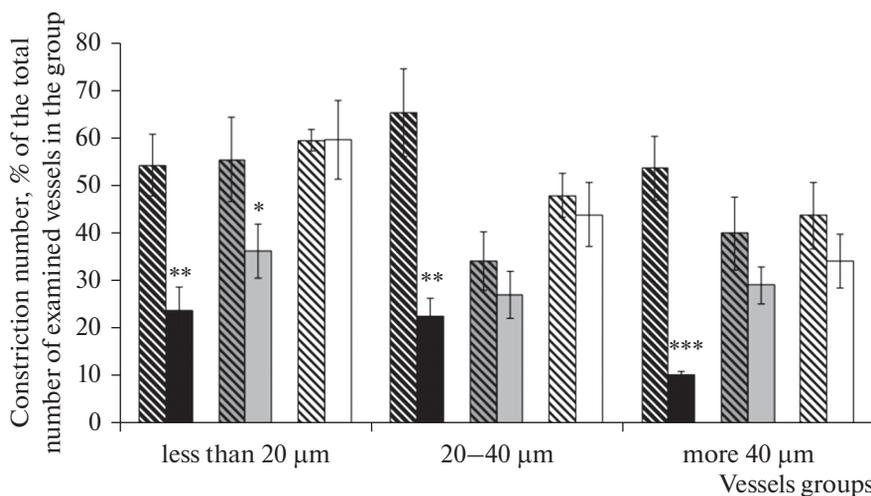
Ишемия изменяла характер дилататорной реакции пиальных артериальных сосудов на воздействие АХ. Через 7 дней после воздействия у крыс, перенесших ишемию, по сравнению с ложнооперированными животными во всех группах исследованных сосудов число АХ-опосредованных дилатаций было меньше в среднем на 35% (рис. 1*a*). Изменение амплитуды дилататорной реакции отмечалось только на сосудах крупных диаметров (рис. 1*b*). На 14-й день число дилататорных реакций на



**Рис. 2.** Дилататорная реакция пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие АХ: *a* – число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов); *b* – диаметр артерий после воздействия АХ (% относительно их диаметра до воздействия АХ). Косая штриховка – ложнооперированные крысы; темная заливка – 7 дней после ишемии; серая заливка – 14 дней после ишемии; белая заливка – 21 день после ишемии. \* – различия достоверны по отношению к соответствующим значениям у ложнооперированных крыс данной группы; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (*U*-критерий Манна–Уитни).

воздействие АХ сосудов всех диаметров оставалось меньше в среднем на 40–45% (рис. 1*a*). Через 21 день число вызванных АХ дилатаций у животных, перенесших ишемию, по сравнению с ложнооперированными животными в группе крупных сосудов было меньше в среднем на 60% ( $p = 0.14$ ,  $U = 794$ , критерий Манна–Уитни), а в группах мелких и средних диаметров – на  $38.4 \pm 9.1$  ( $p = 0.04$ ,  $U = 711.5$ , критерий Манна–Уитни) и  $20.1 \pm 4.7\%$  ( $p = 0.03$ ,  $U = 135.5$ , критерий Манна–Уитни) соответственно (рис. 1). Достоверных изменений амплитуды дилататорной реакции на АХ в период с 14-го по 21-й день после ишемии не наблюдалось (рис. 1*a, b*).

Аппликация глибенкламида у ложнооперированных крыс через 7 дней после оперативного вмешательства вызывала констрикцию в среднем около 60% исследованных сосудов всех диаметров (рис. 2). Число дилататорных реакции на воздействие АХ на фоне предварительного введения глибенкламида уменьшалось: в группе артерий среднего диаметра на  $40.6 \pm 8.1\%$  ( $p = 0.01$ ,  $U = 207.5$ , критерий Манна–Уитни), в остальных группах сосудов – в среднем на 65–70% (рис. 3*a*). В группе мелких артерий глибенкламида также достоверно снижал степень дилататорной реакции (рис. 3*b*). У крыс, перенесших ишемию, через 7 дней после И/Р, аппликация гли-



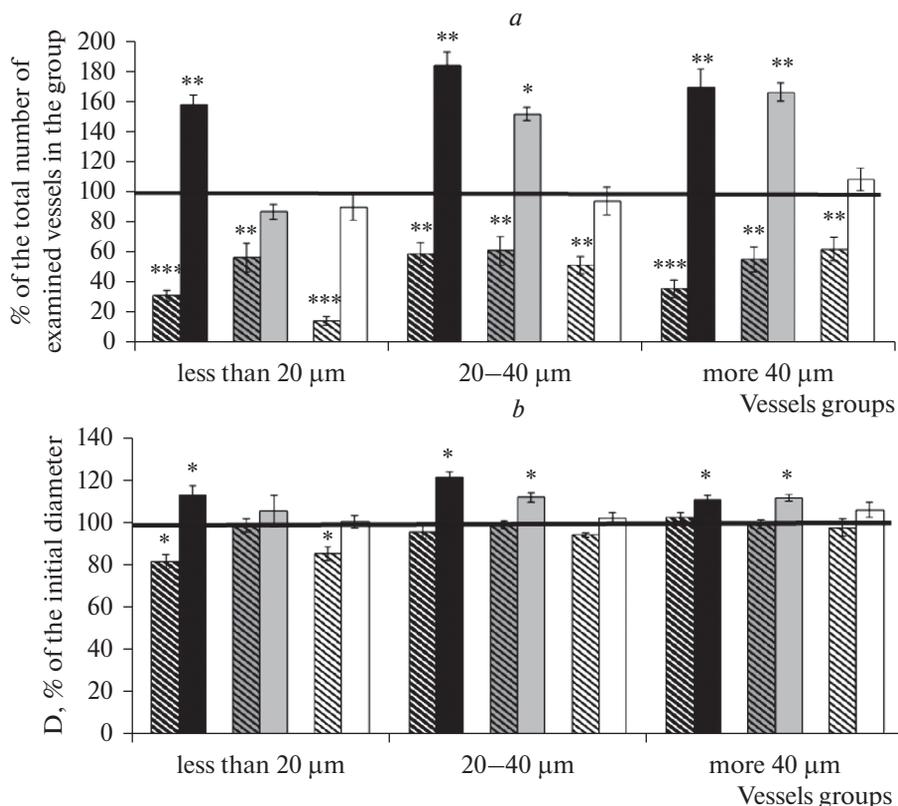
**Рис. 3.** Констрикторная реакция пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие глибенкламида. *Косая штриховка* – ложнооперированные крысы; *темная заливка* – 7 дней после ишемии; *серая заливка* – 14 дней после ишемии; *белая заливка* – 21 день после ишемии. \* – различия достоверны по отношению к соответствующим значениям у ложнооперированных крыс данной группы; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  ( $U$ -критерий Манна–Уитни).

бенкламида вызывала констрикцию  $10.6 \pm 0.8\%$  крупных сосудов и  $23.5\%$  артерий мелких и средних диаметров (рис. 2). Число и амплитуда АХ-опосредованных дилатаций сосудов всех диаметров на фоне предварительного воздействия глибенкламида достоверно увеличивались (рис. 3).

Применение пинацидила у ложнооперированных крыс приводило к вазодилатации  $90.8 \pm 0.8\%$  мелких сосудов, в группах артерий средних и крупных диаметров расширилось в среднем  $65\text{--}80\%$ . У крыс, перенесших ишемию, в ответ на воздействие пинацидила расширилось в среднем около  $65\%$  сосудов всех исследованных групп (рис. 4).

Аппликация глибенкламида у ложнооперированных крыс через 14 дней после операции вызывала констрикцию  $55.9 \pm 8.9\%$  мелких сосудов и около  $35.5\%$  артерий средних и крупных диаметров (рис. 2). Глибенкламид уменьшал число АХ-опосредованных дилатаций пиальных артериальных сосудов всех диаметров (в среднем на  $45\%$ ) без достоверного изменения амплитуды дилататорной реакции (рис. 3). У крыс, перенесших ишемию, через 14 дней после И/Р орошение поверхности головного мозга раствором глибенкламида приводило к констрикции около  $30\text{--}35\%$  сосудов всех исследованных групп (рис. 2). Число дилатаций на воздействие АХ на фоне введения глибенкламида в группах сосудов средних и крупных диаметров увеличивалось на  $27.2 \pm 2.2$  ( $p = 0.04$ ,  $U = 11$ , критерий Манна–Уитни) и  $42.0 \pm 1.1\%$  ( $p = 0.01$ ,  $U = 2553$ , критерий Манна–Уитни) соответственно, а в группе мелких сосудов незначительно снижалось (рис. 3a). В группах средних и крупных артерий также увеличивалась амплитуда дилататорной реакции (рис. 3b). Пинацидил у ложнооперированных крыс этой группы расширял в среднем  $60\text{--}75\%$  сосудов всех исследованных групп. У крыс, перенесших ишемию, через 14 дней после И/Р в ответ на воздействие пинацидила расширилось в среднем около  $30\%$  исследованных сосудов всех диаметров (рис. 4).

Применение глибенкламида у ложнооперированных крыс через 21 день после операции приводило к констрикции  $60.1 \pm 2.2\%$  мелких сосудов и около  $45\%$  арте-



**Рис. 4.** Изменение дилататорной реакции пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие АХ на фоне блокады  $K_{ATP}$ -каналов: *a* – число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов); *b* – диаметр артерий после воздействия АХ (% относительно их диаметра до воздействия АХ). Горизонтальная линия – дилататорная реакция сосудов в группе на введение АХ без применения блокатора, принятая за 100%. Косая штриховка – ложнопериованные крысы; темная заливка – 7 дней после ишемии; серая заливка – 14 дней после ишемии; белая заливка – 21 день после ишемии. \* – изменения значимы по сравнению с соответствующими данными при воздействии АХ без применения блокаторов; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (*U*-критерий Манна–Уитни).

рий средних и крупных диаметров (рис. 2). Число дилататорных реакций на воздействие АХ у ложнопериованных животных на фоне применения глибенкламида в группах сосудов мелких, средних и крупных диаметров уменьшалось (рис. 3*a*). Амплитуда дилататорной реакции снижалась только в группе мелких артерий – в среднем на  $14.7 \pm 2.7\%$  ( $p = 0.05$ ,  $U = 151$ , критерий Манна–Уитни, рис. 3*b*). У животных, перенесших ишемию, реакция пиальных артериальных сосудов всех исследованных диаметров на аппликацию глибенкламида достоверно не отличалась от реакции сосудов ложнопериованных крыс (рис. 2). Характер дилататорных реакций на воздействие АХ на фоне предварительного введения глибенкламида у крыс, перенесших ишемию, через 21 день после воздействия во всех группах сосудов достоверно не изменялся (рис. 3). Аппликация пинацидила у ложнопериованных крыс приводила к расширению  $77.3 \pm 5.9\%$  мелких пиальных артерий. В группах артерий средних и крупных диаметров расширилось в среднем 55–45%

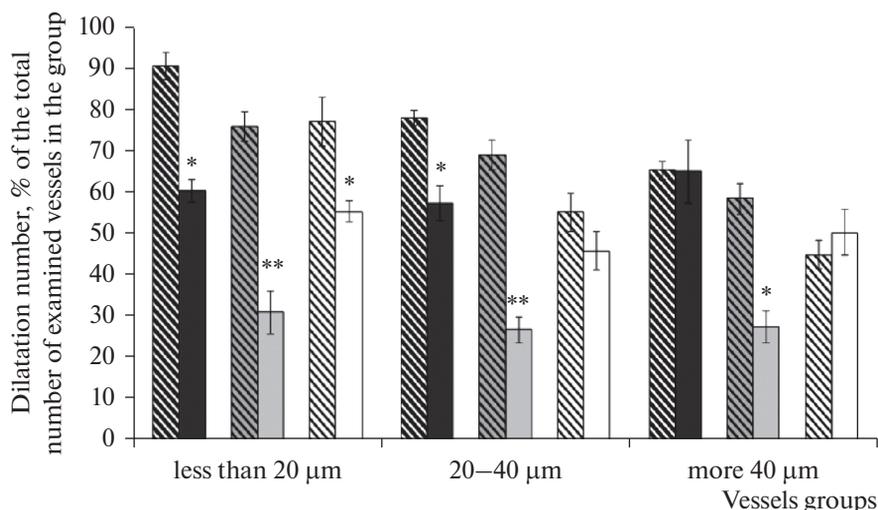
исследованных сосудов. У крыс, перенесших ишемию, пинацидил вызывал дилатацию  $55.6 \pm 2.6\%$  мелких пиальных артерий, с увеличением диаметра сосудов число вазодилатаций в ответ на воздействие пинацидила снижалось и в группе крупных артерий составило  $40.5 \pm 5.6\%$  (рис. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование показало, что однократная глобальная И/Р коры головного мозга крыс, вызванная окклюзией обеих сонных артерий с управляемой гипотензией, приводила к угнетению АХ-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов, которое сохранялось на протяжении 21-го дня после восстановления кровотока. Развитие сосудистой дисфункции после ишемии и последующей реперфузии может быть связано с нарушением активности ионных каналов. Важным механизмом, обеспечивающим вазодилатацию мозговых сосудов, является активация АТФ-чувствительных калиевых каналов [3, 4]. Хорошо известно, что ишемия запускает каскад биохимических процессов, протекающих на клеточном и субклеточном уровнях, который приводит к метаболическим нарушениям в ткани мозга [6, 12]. Ишемический каскад обычно продолжается часами, но может длиться и более продолжительное время после восстановления кровотока.  $K_{AT\Phi}$ -каналы играют значительную роль в регулировании клеточных функций в ответ на изменение клеточного метаболизма [6, 13].

Применение глибенкламида, являющегося селективным ингибитором всех видов  $K_{AT\Phi}$  каналов [13], у ложнооперированных животных в наших экспериментах приводило к констрикции в среднем 50–60% пиальных артериальных сосудов всех диаметров. Число и амплитуда АХ-опосредованных дилататорных реакций сосудов, предварительно подвергнутых воздействию глибенкламида, в группах артерий всех диаметров у ложнооперированных крыс достоверно уменьшались. Эти данные показывают, что в физиологических условиях  $K_{AT\Phi}$ -каналы участвуют в поддержании базального тонуса и обеспечении вазодилататорных реакций пиальных артериальных сосудов на воздействие АХ. Механизм АХ-опосредованной активации  $K_{AT\Phi}$ -каналов остается не до конца изученным. Высказывается предположение, что вызванная АХ вазодилатация сопровождается выработкой оксида азота, который, воздействуя на эндотелий сосудистой стенки, моделирует сигнальный каскад, активирующий каналы:  $NO \rightarrow$  растворимая гуанилатциклаза  $\rightarrow$  циклический гуанозинмонофосфат  $\rightarrow K_{AT\Phi}$ -каналы [14, 15].

У крыс, перенесших ишемию, через 7 дней после ишемического воздействия роль  $K_{AT\Phi}$ -каналов в поддержании базального тонуса пиальных артерий снижалась, на что указывало уменьшение числа констрикторных реакций на аппликацию глибенкламида в группах артерий всех диаметров, по сравнению с реакциями сосудов в соответствующих группах ложнооперированных животных. Одним из компонентов, влияющих на активность АТФ-чувствительных каналов, является  $NO$  [14]. Ранее нами было показано, что в первые 7 дней после однократной кратковременной ишемии головного мозга у крыс происходит изменение вазомоторной функции эндотелия пиальных артериальных сосудов, связанное с нарушением продукции оксида азота [15], это может являться причиной ослабления активации АТФ-чувствительных  $K^+$ -каналов. Уменьшение числа сузившихся на воздействие глибенкламида сосудов после ишемии также может быть связано со снижением плотности  $K_{AT\Phi}$ -каналов в клетках. Косвенным доказательством этому может служить тот факт, что применение в наших экспериментах открывателя  $K_{AT\Phi}$ -каналов пинацидила, снижающего чувствительность каналов к АТФ и приводящего к увеличению их открытия при существующем уровне АТФ в клетке [13], у крыс, пере-



**Рис. 5.** Дилататорная реакция пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие пинацидила. *Косая штриховка* – ложноперированные крысы; *темная заливка* – 7 дней после ишемии; *серая заливка* – 14 дней после ишемии; *белая заливка* – 21 день после ишемии. \* – различия достоверны по отношению к соответствующим значениям у ложноперированных крыс данной группы; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  ( $U$ -критерий Манна–Уитни).

несших ишемию, по сравнению с ложноперированными животными вызывало расширение меньшего числа сосудов мелких и средних диаметров. Хотя нельзя исключать и тот факт, что изменение реакции сосудов на воздействие пинацидила после И/Р, может быть следствием того, что большое количество  $K_{ATФ}$ -каналов мембраны гладкомышечных клеток пиальных артериальных сосудов у крыс, перенесших ишемию, еще до воздействия пинацидила находятся в открытом состоянии. Известно, что основным последствием ишемических состояний является уменьшение уровня митохондриального АТФ [6, 12, 17]. Снижение соотношения АТФ/АДФ может являться одной из причин открытия  $K_{ATФ}$ -каналов [13]. Также открытию каналов могут способствовать и другие последствия И/Р, такие как клеточный ацидоз, оксидативный стресс, изменение продукции аденозина, содержания фосфолипидов, которые могут снижать чувствительность канала к АТФ [1, 13, 18].

На протяжении последующего постишемического периода в наших экспериментах различия в реакциях пиальных артериальных сосудов на воздействие глибенкламида у крыс, перенесших ишемию, и ложноперированных животных уменьшались. Через 14 дней после И/Р достоверные отличия наблюдались только в группе сосудов мелких диаметров, а через 21 день реакции сосудов всех исследованных диаметров на аппликацию глибенкламида достоверно не отличались от реакций сосудов у ложноперированных крыс. В ответ на применение пинацидила через 14 дней после И/Р число расширившихся артерий всех диаметров оставалось меньше, чем у ложноперированных крыс, а через 21 день достоверные отличия наблюдались только в группах мелких сосудов. Следовательно, можно утверждать, что к 21-му дню после И/Р активность  $K_{ATФ}$ -каналов и их роль в поддержании базального тонуса пиальных артериальных сосудов восстанавливается.

Характер дилататорной реакции пиальных артериальных сосудов на воздействие АХ на фоне предварительной блокады  $K_{ATФ}$ -каналов у крыс, перенесших ишемию, так же, как и у ложноперированных животных, менялся. В первые 14 дней после

И/Р предварительное введение глибенкламида достоверно усиливало дилатацию. Через 7 дней после ишемии на фоне введения глибенкламида достоверно увеличилось число и амплитуда АХ-опосредованных дилатаций пиальных сосудов всех диаметров. Через 14 дней увеличение числа и амплитуды дилатации на фоне блокады  $K_{ATP}$ -каналов отмечалось только в группе сосудов средних и крупных диаметров. Число дилатаций мелких артерий незначительно снижалось. В литературе имеются сведения о том, что эффективность ингибиторов  $K_{ATP}$ -каналов зависит от уровня внутриклеточных нуклеотидов, при этом особенно важную роль играет Mg-АДФ, уровень которого значительно возрастает при ишемии и гипоксии [19]. Поэтому существует потенциальная возможность возникновения проблем при использовании этих соединений в условиях измененного постишемического метаболического статуса и повышения уровня внутриклеточного АТФ. Глибенкламид в этих условиях может, напротив, усиливать калиевый ток [5, 13, 19], что, вероятно, и является причиной извращения АХ-опосредованных сосудистых реакций в течение первых 14 дней после И/Р. Через 21 день после ишемии глибенкламид не изменял характер АХ-опосредованных дилататорных реакций сосудов всех диаметров.

Таким образом, нами было установлено, что однократная кратковременная глобальная ишемия коры головного мозга крыс приводит к снижению вклада  $K_{ATP}$ -каналов в поддержание базального тонуса пиальных артериальных сосудов, которое сохраняется на протяжении 14-ти дней после ишемического воздействия. Одновременно с этим снижается роль АТФ-чувствительных калиевых каналов в осуществлении АХ-опосредованных дилататорных реакций пиальных сосудов. И к 21-му дню после ишемии  $K_{ATP}$ -каналы практически не участвуют в дилататорном ответе на АХ. АТФ-чувствительные калиевые каналы служат ключевыми модуляторами сосудистой гладкомышечной активности, регулирующей спонтанные вазомоции [20, 21]. Поэтому постишемическое нарушение процессов  $K_{ATP}$ -сигнализации и снижение вклада АТФ-чувствительных калиевых каналов в регуляции сосудистого тонуса может приводить к возникновению периодических эпизодов вазоспазма и являться причиной возникновения повторных ишемических состояний. Полученные нами результаты могут лечь в основу нового, перспективного подхода к лечению патологического ухудшения церебрального кровотока после перенесенных ишемических состояний.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Источник финансирования – госбюджет. Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (47\_110\_ДРиОК, раздел 64.1).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.П.Г.), сбор данных (И.Б.С.), обработка данных (О.П.Г., И.Б.С.), написание и редактирование статьи (О.П.Г., И.Б.С.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Huang Y, Hu D, Huang C, Nichols CG* (2019) Genetic discovery of ATP-sensitive  $K^+$  channels in cardiovascular diseases. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 12(5): e007322. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.119.007322>

2. *Lorigo M, Oliveira N, Cairrao E* (2020) Clinical importance of the human umbilical artery potassium channels. *Cells* 9(9): 1956.  
<https://doi.org/10.3390/cells9091956>
3. *Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF* (2017) Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr Physiol* 7(2): 485–581.  
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
4. *Shekhar S, Liu R, Travis OK, Roman RJ, Fan F* (2017) Cerebral autoregulation in hypertension and ischemic stroke: a mini review. *J Pharm Sci Exp Pharmacol* (1): 21–27.
5. *Syed AU, Koide M, Brayden JE, Wellman GC* (2019) Tonic regulation of middle meningeal artery diameter by ATP-sensitive potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 39(4): 670–679.  
<https://doi.org/10.1177/0271678X17749392>
6. *Szeto V, Chen NH, Sun HS, Feng ZP* (2018) The role of  $K_{ATP}$  channels in cerebral ischemic stroke and diabetes. *Acta Pharmacol Sin* 39(5): 683–694.  
<https://doi.org/10.1038/aps.2018.10>
7. *Armstead WM, Riley J, Cines DB, Higazi AA-R* (2011) tPA contributes to impairment of ATP and Ca sensitive K channel mediated cerebrovasodilation after hypoxia/ischemia through upregulation of ERK MAPK. *Brain Res* 28: 1376: 88–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.052>
8. *Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M* (2009) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 7: 97.  
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-97>
9. *Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK* (1984) Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat: 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 69: 385–401.
10. *Шуваева ВН, Горшкова ОП* (2018) Модуляция тонуса церебральных артерий ацетилхолином у крыс разных линий. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 104(7): 807–816. [*Shuvaeva VN, Gorshkova OP* (2018) Modulation of the tone of the cerebral arteries with acetylcholine in rats of different lines. *Russ J Physiol* 104(7): 807–816. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.7868/S0869813918070067>
11. *Soltani N, Mohammadi E, Allahtavakoli M, Shamsizadeh A, Roohbakhsh A, Haghparsat A* (2016) Effects of dimethyl sulfoxid on neuronal response characteristics in deep layers of rat barrel cortex. *Basic Clin Neurosci* 7(3): 213–220.  
<https://doi.org/10.15412/J.BCN.03070306>
12. *Findlay I* (1993) Sulphonylurea drugs no longer inhibit ATP-sensitive  $K^+$  channels during metabolic stress in cardiac muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 456–467.
13. *Foster MN, Coetzee WA* (2016)  $K^+$ ATP Channels in the cardiovascular system. *Physiol Rev* 96(1): 177–252.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2015>
14. *Gendron ME, Thorin E, Perrault LP* (2004) Loss of endothelial KATP channel-dependent, NO-mediated dilation of endocardial resistance coronary arteries in pigs with left ventricular hypertrophy. *Br J Pharmacol* 143(2): 285–291.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705937>
15. *Zhang DM, Chai Y, Erickson JR, Brown JH, Bers DM, Lin YF* (2014) Intracellular signalling mechanism responsible for modulation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels by nitric oxide in ventricular cardiomyocytes. *J Physiol* 592(5): 971–990.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264697>
16. *Горшкова ОП, Шуваева ВН, Лениман МВ, Артемьева АИ* (2016) Постишемические изменения вазомоторной функции эндотелия. *Совр пробл науки образов* 5. [*Gorshkova OP, Shuvaeva VN, Lentsman MV, Artemyeva AI* (2016) Postischemic changes in the vasomotor function of the endothelium. *Modern problems of science and education* 5. (In Russ)]. <http://science-education.ru/ru/article/view?id=25270> (accessed: 09.06.2021)
17. *Yang JL, Mukda S, Chen SD* (2018) Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke. *Redox Biol* 16: 263–275.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.002>
18. *Dunn KM, Nelson MT* (2014) Neurovascular signaling in the brain and the pathological consequences of hypertension. *Am J Physiol* 306(1): H1–H14.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00364.2013>
19. *Venkatesh N, Lamp ST, Weiss JN* (1991) Sulfonylureas, ATP-sensitive  $K^+$  channels, and cellular  $K^+$  loss during hypoxia, ischemia, and metabolic inhibition in mammalian ventricle. *Circul Res* 69: 623–637.  
<https://doi.org/10.1161/01.res.69.3.623>
20. *Chutkow WA, Pu J, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF, McNally EM* (2002) Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2  $K(ATP)$  channels. *J Clin Invest* 110(2): 203–208.  
<https://doi.org/10.1172/JCI15672>

21. Palygin O, Miller BS, Nishijima Y, Zhang DX, Staruschenko A, Sorokin A (2019) Endothelin receptor A and p66Shc regulate spontaneous  $Ca^{2+}$  oscillations in smooth muscle cells controlling renal arterial spontaneous motion. *FASEB J* 33(2): 2636–2645.  
<https://doi.org/10.1096/fj.201800776RR>

### Changes in the Contribution of $K_{ATP}$ -Channels to the Basal Tone and Dilatation of the Rat Pial Arterial Vessels after Ischemia

O. P. Gorshkova<sup>a, \*</sup> and I. B. Sokolova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

\*e-mail: o\_gorshkova@inbox.ru

The changes in the contribution of ATP-sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$ ) to the basal tone and acetylcholine (ACh) mediated dilatation of pial arterial vessels after global cerebral ischemia (2VO + hypo model) were studied in Wistar rats. Vascular examination was performed 7, 14 and 21 days after ischemia. False-operated rats served as a control. The change in the contribution of  $K_{ATP}$  channels to the basal tone was assessed using intravital microphotography. The number of vessels that constricted in response to the effect of the  $K_{ATP}$  channel blocker (glibenclamide, 10  $\mu$ M) was assessed. The change in the contribution of channels to the vascular dilatation was assessed by comparing the number and degree of arterial dilatation in response to the ACh ( $10^{-7}$  M, 5 min) before and after the use of a  $K_{ATP}$  channel blocker. It was found that ischemia decreases the role of ATP-sensitive potassium channels in basal tone of the pial arterial vessels for 14 days after ischemic exposure. At the same time, the contribution of  $K_{ATP}$ -channels to the ACh mediated dilator reactions of pial vessels decreases. By the 21st day after ischemia,  $K_{ATP}$  channels do not participate in the dilator response to ACh.

*Keywords:* ATP-sensitive potassium channels, cerebral ischemia, pial arterial vessels

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК  
НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА И КОНЦЕНТРАЦИЮ БЕЛКА  
ИРИСИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

© 2021 г. Ю. А. Бондарчук<sup>1, 2, \*</sup>, И. И. Шахматов<sup>1, 2</sup>, И. Н. Манаева<sup>1, 2</sup>,  
В. М. Раевских<sup>1</sup>, П. С. Маршалкина<sup>1</sup>, Д. А. Прокопец<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

\*E-mail: bondarchuk2606@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.12.2020 г.

После доработки 05.02.2021 г.

Принята к публикации 02.03.2021 г.

В настоящее время актуальным является поиск немедикаментозных методов сохранения здоровья и увеличения продолжительности жизни людей. Известно, что умеренные физические нагрузки способствуют активному долголетию. Важная роль в адаптации к физическим тренировкам принадлежит системе гемостаза, изменение показателей которой может влиять на развитие осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы в ответ на физический стресс. В 2012 г. был открыт гормон ирисин, уровень которого снижается с увеличением возраста. Белок ирисин синтезируется во время физической нагрузки и препятствует развитию возрастных заболеваний, в том числе гипертонической болезни, болезнью Паркинсона и Альцгеймера. Цель исследования – разработка оптимального режима физических нагрузок, сохраняющего гемостазиологические параметры в пределах нормы и приводящего к увеличению концентрации белка ирисина в крови. Исследования выполнены на молодых крысах-самцах линии Вистар. В течение 30 дней опытные животные подвергались физическим нагрузкам в виде ходьбы в тредбане со скоростью 6–8 м/мин. Животные первой опытной группы подвергались физическим нагрузкам ежедневно в течение 2-х ч, животные второй группы подвергались 2-часовым физическим нагрузкам в режиме 3 раза в неделю (понедельник, среда, пятница). Показано, что в первой опытной группе на фоне признаков гиперкоагуляции уровень ирисина увеличивался на 130%. Во второй опытной группе признаки гиперкоагуляции отсутствовали, при этом концентрация ирисина повышалась на 225%. Таким образом, более эффективным режимом физических нагрузок для крыс является принудительная ходьба в тредбане в течение 2 ч со скоростью 6–8 м/мин 3 раза в неделю на протяжении 30 дней.

*Ключевые слова:* физическая нагрузка, система гемостаза, пьезотромбоэластография, калиброванная автоматизированная тромбография, ирисин

DOI: 10.31857/S0869813921080033

**ВВЕДЕНИЕ**

В связи с постоянным увеличением продолжительности жизни и, как следствие, старением общества, поиск немедикаментозных методов сохранения здоровья и продления активного долголетия людей пожилого и старческого возраста в настоя-

щее время становится все более актуальной задачей. Известно, что физические тренировки повышают иммунитет, предотвращают развитие метаболических заболеваний и способствуют активному долголетию [1–4]. При этом выбор оптимального по интенсивности и кратности режима физических нагрузок, оказывающего максимально благотворное влияние на организм, нуждается в дополнительном обосновании, основанном, в том числе, и на данных исследования регуляторных молекул, выявленных на протяжении последнего десятилетия.

В 2012 г. группа ученых, работавшая под руководством Shpiegelman (Бостон, США), обнаружила специфический белок ирисин, вырабатывающийся при физической нагрузке, синтез которого снижается по мере старения [5]. Установлено, что под воздействием ирисина происходит переход белого жира в бурый, который, в свою очередь, связан с химической терморегуляцией [6]. Доказана тесная связь между концентрацией ирисина и длиной теломер – маркеров продолжительности жизни клетки [7–12]. Повышение концентрации белка ирисина в крови сопровождается улучшением течения “возрастных” заболеваний, в том числе, гипертонической болезни [13, 14], а также болезнью Паркинсона и Альцгеймера [15]. Доказано, что выделение ирисина связано с физической работой, однако также установлено, что не любая физическая нагрузка приводит к увеличению его концентрации в крови [5].

Ирисин содержится в мышцах и крови на определенном уровне, независимо от физической работы. Так, в частности, методом вестерн-блоттинга установлено, что концентрация ирисина увеличивается сразу после однократной интенсивной принудительной физической нагрузки (бег на беговой дорожке) [16], которая, в свою очередь, может приводить к ухудшению течения заболеваний сердечно-сосудистой системы и сопутствующих патологий. Следовательно, актуальным является поиск режимов физических тренировок, которые бы сопровождалась увеличением концентрации ирисина в крови, и при этом не приводили к развитию патологических состояний со стороны системной гемодинамики.

В развитии осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы в ответ на физический стресс важная роль принадлежит системе гемостаза [17, 18], сбалансированность отдельных звеньев которой во многом обеспечивает процессы адаптации к физическим нагрузкам [19]. Система гемостаза является одной из наиболее реактивных систем организма, и ее роль в процессах адаптации не вызывает сомнения [20]. Известно, что тридцатидневные физические тренировки приводят к завершённой долговременной адаптации [20] и широко используются в клинике для профилактики риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Исходя из этого, целью исследования явилась разработка оптимального режима физических нагрузок, сохраняющего гемостазиологические параметры в пределах нормы и приводящего к увеличению концентрации белка ирисина в крови.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 54 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 12–13 нед., массой 250–300 г. Животные были размещены в клетках с полубарьерной системой в экологически контролируемых условиях с 12-часовыми светлым и темным циклами, при комнатной температуре  $22.5 \pm 0.28^\circ\text{C}$  и влажности воздуха 50–60%. Пресная водопроводная вода и корм находились в свободном доступе. Животные были разделены на две контрольные и две опытные группы. Крысы первой контрольной группы ( $n = 12$ ) ежедневно помещались в индивидуальные отсеки неподвижного тредбана на 2 ч в течение 30 дней. Во второй контрольной группе ( $n = 12$ ) крысы находились по 2 ч в отсеках неподвижного тредбана 3 раза в неделю (понедельник, среда, пятница) на протяжении 30 дней. Таким образом, животные кон-

трольных групп не подвергались физическим нагрузкам. Крысы, составлявшие опытные группы, подвергались 2-часовой принудительной ходьбе в тредбане со скоростью 6–8 м/мин на протяжении 30 дней в двух разных режимах: животные первой опытной группы ( $n = 12$ ) подвергались ежедневным физическим нагрузкам, крысы второй опытной группы ( $n = 18$ ) – физическим нагрузкам в режиме 3 раза в неделю (понедельник, среда, пятница). Физические нагрузки проводили в вечернее время с 18 до 22 ч, что соответствует времени бодрствования крыс.

С целью адаптации к новому помещению, за неделю до эксперимента всех животных в виварии помещали в стандартные условия содержания. Проведение экспериментов на крысах осуществляли в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента (Совет от 22 сентября 2010 г.) по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте [21]. Обезболивание и умерщвление животных проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”. Работа была одобрена этическим комитетом Алтайского государственного медицинского университета Минздрава РФ (протокол № 8 от 22.10.2018 г.).

Перед забором крови предварительно производили наркотизацию путем внутривенного введения раствора телазола из расчета 14 мг/кг массы тела животного. Для исследования системы гемостаза, кровь получали из печеночного синуса в объеме 5 мл, из которых 0.4 мл крови без добавления цитрата натрия использовали для проведения низкочастотной пьезотромбоэластографии. Остальную порцию крови помещали в полистироловые центрифужные пробирки с полихлорвиниловыми крышками, содержащими 0.11 М (3.8%) раствор цитрата натрия (соотношение крови и стабилизатора 9 : 1). Кровь центрифугировали при 1200 g в течение 15 мин для получения обедненной тромбоцитами плазмы крови.

Оценку гемостатического потенциала крови у животных производили методом НПТЭГ – низкочастотной пьезотромбоэластографии, на аппарате АРП-01М “Меднорд” (Россия) с использованием специальной компьютерной программы ИКС ГЕМО-3 [22, 23].

Оценивали следующие показатели:

t3 – время свертывания крови, мин [Blood clotting time, min].

t5 – время формирования фибрин-тромбоцитарной структуры сгустка, мин [Time of formation of the fibrin-platelet structure of the clot, min].

ИПС – интенсивность полимеризации сгустка, о.е. [ICP – Intensity of clot polymerization, r.u.].

В рамках экспериментальных исследований системы гемостаза также применяли интегральный метод калиброванной автоматизированной тромбографии по Hemker (2003) [24, 25] с использованием планшетного флуориметра Fluoroskan Ascent при длине волны 390 нм (фирма ThermoFisher SCIENTIFIC, Финляндия), с программным обеспечением Thrombinoscope® 3.0.0.26 и наборами реагентов фирмы Thrombinoscope® bv (Нидерланды) (PPP-Reagent, Thrombin Calibrator, FluCa-Kit). Коагуляцию исследуемой плазмы крови осуществляли в 96-луночном планшете типа Immulon 2NB (фирма ThermoFisher SCIENTIFIC, США). Оценивали следующие показатели тромбографии:

– Lagtime, мин – время инициации образования тромбина [Lagtime, min – thrombin initiation time].

– ETP, нмоль мин – эндогенный тромбиновый потенциал [ETP, nmol min – endogenous thrombin potential].

– Peak thrombin, нмоль – пиковая концентрация тромбина [Peak thrombin, nmol – peak thrombin concentration].

– ttPeak (time to peak), мин – время достижения пиковой концентрации тромбина [ttPeak (time to peak), min – time of reaching peak thrombin concentration].

Для определения концентрации ирисина, по истечении 30 дней эксперимента осуществляли забор крови для получения сыворотки у контрольных и опытных животных. Кровь для исследования белков в объеме 2 мл получали путем забора из печеночного синуса в одноразовый полистироловый шприц с широкой иглой, не содержащий антикоагулянт. Полученную сыворотку замораживали при температуре минус 70°C. Перед процедурой анализа образцы размораживали при комнатной температуре. Содержание ирисина выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с применением специальных наборов для крыс фирмы USCN Cloud Clone Corp (США) на аппарате Chem Well (США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистического программного обеспечения MedCalc Version 17.9.7 (лицензия BU556-P12YT-BBS55-YAH5M-UBE51). Для статистической обработки результатов исследования применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Данные непараметрических совокупностей представлены в виде медианы (Me) и квартилей [25 и 75%]. Для всех тестов статистически достоверными считали различия, уровень значимости которых отвечал условию  $p < 0.05$ .

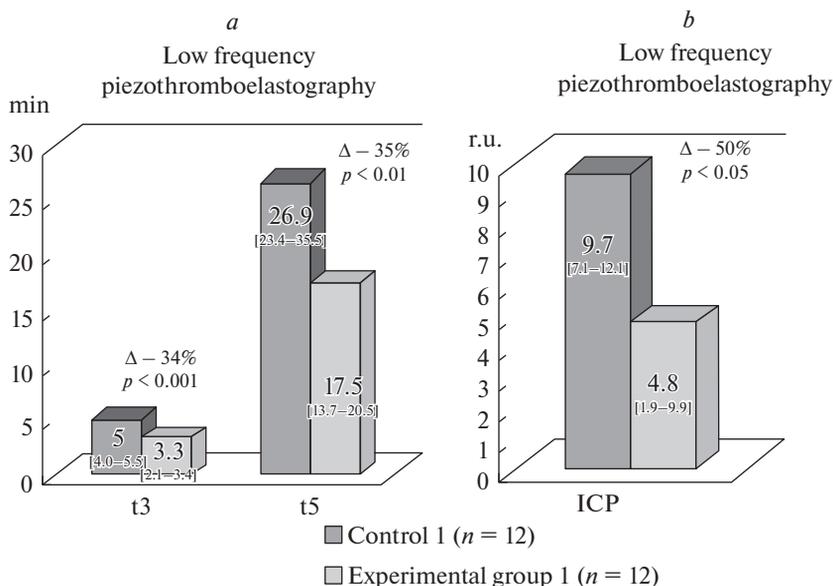
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У животных, подвергавшихся ежедневным 2-часовым нагрузкам, отмечалось снижение показателей пьезотромбоэластографии по сравнению с контрольной группой. Так, время свертывания крови (t3) уменьшалось на 34%, что свидетельствовало о сдвиге точки желирования влево и характеризовало состояние хронометрической гиперкоагуляции. Параллельно с этим отмечалось снижение времени достижения максимальной амплитуды (t5) на 35%, что подтверждало гиперкоагуляционные изменения в первой опытной группе. При этом отмечалось снижение показателя ИПС (интенсивность полимеризации сгустка) на 50% в группе животных, подвергавшихся ежедневным физическим нагрузкам по сравнению с группой контроля (рис. 1). Этот показатель характеризует полимеризационный этап фибриногенеза, а именно – латеральную сборку фибрина, следовательно, можно предположить, что этот процесс у данных крыс был угнетен. Во второй опытной группе показатели пьезотромбоэластографии не имели достоверных отличий от значений, зарегистрированных у контрольных животных.

По данным калиброванной автоматизированной тромбографии, у животных, составлявших первую опытную группу, регистрировались признаки нарастания тромбинемии, что проявлялось в увеличении эндогенного тромбинового потенциала (ETP) на 24%, повышении пиковой концентрации тромбина (Peak) на 13% и укорочении времени достижения максимальной концентрации тромбина (ttPeak) на 5.6% по сравнению с контролем. У крыс второй опытной группы показатели тромбографии не отличались от таковых у контрольных животных (табл. 1).

Результаты представлены в таблице в виде (Me [25–75%]), где Me – медиана в выборочной совокупности; [25–75%] – 25-й и 75-й перцентиль;  $\Delta 1$  – статистически значимая разница опытной группы 1 с контрольной группой 1 при  $p < 0.05$ ;  $p_{1-2}$  – уровень статистической значимости различий опытной группы 1 (ежедневные 2-часовые физические нагрузки) с контрольной группой 1;  $p_{3-4}$  – уровень статистической значимости различий опытной группы 2 (физические нагрузки в режиме 3 раза в неделю) с контрольной группой 2;  $n$  – количество животных в исследуемой группе.

Результаты проведенного иммуноферментного анализа показали, что у животных 1-й и 2-й контрольных групп концентрация ирисина в сыворотке достоверно не отличалась. В первой опытной группе после ежедневных физических нагрузок уровень ирисина увеличился на 133% ( $p = 0.04$ ), в то время как у крыс второй опытной группы, тренировавшихся в режиме три раза в неделю, концентрация ирисина повышалась на 225% ( $p = 0.001$ ) по сравнению с контрольной группой (рис. 2).



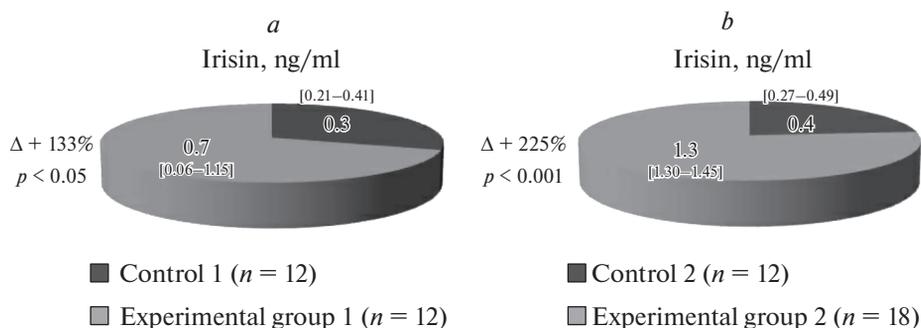
**Рис. 1.** Изменение показателей гемостаза по данным пьезотромбоэластографии после 30-дневных физических нагрузок.

Результаты представлены в виде (Me [25–75%]), где Me – медиана в выборочной совокупности; [25–75%] – 25-й и 75-й перцентиль.  $\Delta$  – статистически значимая разница опытной группы с контрольной группой при  $p < 0.05$ ;  $p$  – уровень статистической значимости различий опытной группы 1 (ежедневные 2-часовые тренировки) с контрольной группой 1. (a) – время свертывания крови (t3), мин; время формирования фибрин-тромбоцитарной структуры сгустка (t5), мин; (b) – интенсивность полимеризации сгустка (ИПС), о. е.

Зафиксированное отличие концентрации ирисина между экспериментальными группами оказалось статистически значимым. Во второй опытной группе содержание ирисина было на 86% выше, чем в первой опытной группе ( $p = 0.03$ ).

**Таблица 1.** Изменение показателей гемостаза по данным калиброванной автоматизированной тромбографии у контрольных и опытных животных после 30-дневных физических нагрузок

Показатели	Контрольная группа 1 (n = 12)	Опытная группа 1 (n = 12)	Контрольная группа 2 (n = 12)	Опытная группа 2 (n = 18)
Lagtime, мин	1.67 [1.57–2.00]	2.00 [1.67–2.00] $p_{1-2} = 0.47$	1.67 [1.57–2.00]	1.63 [1.46–1.80] $p_{3-4} = 0.32$
ETP, нмоль мин	326.1 [277.4–378.4]	404.6 [380.5–453.7] $p_{1-2} < 0.05$ ( $\Delta I + 24\%$ )	326.1 [277.4–378.4]	348.1 [310.7–387.3] $p_{3-4} = 0.93$
Peak thrombin, нмоль	92.7 [84.6–101.3]	105.0 [99.7–109.3] $p_{1-2} < 0.05$ ( $\Delta I + 13\%$ )	92.0 [80.4–107.0]	90.5 [80.8–95.4] $p_{3-4} = 0.58$
ttPeak, мин	4.24 [4.14–4.33]	4.00 [3.92–4.00] $p_{1-2} < 0.01$ ( $\Delta I - 5\%$ )	3.80 [3.67–3.90]	3.80 [3.72–3.89] $p_{3-4} = 0.66$



**Рис. 2.** Изменения концентрации ирисина после 30-дневных физических нагрузок. Результаты представлены в виде (Me [25–75%]), где Me – медиана в выборочной совокупности; [25–75%] – 25-й и 75-й перцентиль.  $\Delta$  – статистически значимая разница опытной группы с контрольной группой при  $p < 0.05$ ;  $p$  – уровень статистической значимости различий опытной группы с контрольной группой. (a) – изменение концентрации ирисина в опытной группе 1 по сравнению с контролем 1 (ежедневные 2-часовые физические нагрузки). (b) – изменение концентрации ирисина в опытной группе 2 по сравнению с контролем 2 (2-часовые физические нагрузки в режиме 3 раза в неделю).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Различные режимы физических нагрузок могут вызывать как адаптивные, так и дизадаптивные ответные реакции со стороны организма. Раскрытие закономерностей реакции системы гемостаза на различные режимы физической активности имеет существенное значение для разработки тренировочных методик и предотвращения различных проявлений внутрисосудистого свертывания крови [13, 14].

Известно, что физическая нагрузка приводит к повышению агрегационной активности тромбоцитов, увеличению экспрессии тканевого фактора и активатора плазминогена эндотелиальными клетками, в результате чего развивается гиперкоагуляция с активацией фибринолитической системы [26]. В предшествующих работах нами было показано, что многократные двухчасовые физические тренировки по сравнению с более длительными являются наиболее оптимальными, так как сопровождаются гипокоагуляционной направленностью и приводят к долговременной адаптации со стороны системы гемостаза [20]. К тридцатому дню тренировочного процесса наблюдается приближение гемостазиологических параметров к нормальным значениям, однако в наших экспериментах у животных первой опытной группы сохранялась тенденция к повышению свертывающей активности крови. Следовательно, режим физических тренировок, используемый во второй опытной группе, оказался более благоприятным и приводил к полной долговременной адаптации со стороны системы гемостаза, проявляющейся в нормализации ее параметров.

Любой стресс, в том числе и физический, активирует все защитные системы организма, такие как белки теплового шока (HSP), врожденный и приобретенный иммунитет, систему гемостаза, белки острой фазы воспаления (БОВ), а также влияет на уровень белков “молодости и старости” [27, 28]. При мышечной деятельности в скелетных мышцах повышается содержание фактора транскрипции PGC1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$ ), что приводит к появлению мембранного белка FNDC5, который расщепляется с образованием ирисина, выделяемого в кровь [29]. Вместе с коактиватором PPAR- $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) PGC1 $\alpha$  в бурых жировых клетках активирует производство белка термогена (UCP1). Ирисин, взаимодействуя с белыми жировыми клетками, также индуцирует экспрессию термогена, который, в свою

очередь, расщепляет протеин 1-UCP-1 (uncoupling protein-1) и запускает процесс перехода белых адипоцитов в бурые [5]. Бурая жировая ткань оказывает существенное влияние на обмен веществ, и ее количество обратно коррелирует с индексом массы тела [30]. Таким образом, физическая нагрузка приводит к увеличению в мышцах PGC1 $\alpha$ , а, следовательно, и к повышению концентрации ирисина [5, 31].

Последующие исследования [32] показали, что регулярные тренировки повышали уровень ирисина в плазме крови в определенный момент, однако при дальнейшем продолжении тренировок роста концентрации ирисина в крови не наблюдалось. Возможно, что в процессе тренировок формируется адаптивный механизм, в результате которого постоянно тренирующиеся люди становятся менее зависимыми от содержания ирисина, либо более чувствительными к его действию. Интенсивная физическая работа сопровождается увеличением производства свободных радикалов и окислительным стрессом, с вовлечением в процесс эндоплазматического ретикулума, что при чрезмерной нагрузке может приводить к повреждению и гибели мышечных волокон. С другой стороны, переходные стадии процесса перекисного окисления и стресса эндоплазматического ретикулума необходимы для полноценной адаптации при регулярных физических нагрузках. Митохондрии играют основную роль в генерации энергии и тесно связаны со стрессом эндоплазматического ретикулума и окислительным стрессом. В то же время экспрессия гена *FNDC5* и повышение концентрации ирисина при физических нагрузках связаны с транскрипционным фактором PGC1 $\alpha$  и практически не зависят от стресса эндоплазматического ретикулума [33].

По данным литературы [34], особенно много ирисина содержится в сердечной мышце, а также в перикарде как до, так и после физической нагрузки. В скелетных мышцах мышцей концентрация ирисина незначительна. Данный факт говорит о том, что при физической нагрузке ирисин выделяется в кровь основном из сердечной мышцы.

Возможно, что при ежедневных физических нагрузках, несмотря на более интенсивное образование ирисина, происходит его расход в больших количествах на местную регуляцию метаболических процессов. Следовательно, концентрация ирисина в крови после ежедневных нагрузок может быть ниже, чем после нагрузок в режиме 3 раза в неделю.

Режим ежедневных физических тренировок не может предоставить организму достаточного времени для полноценного восстановления в мышцах общих запасов энергетических веществ, служащих субстратами анаэробных биохимических реакций. В то же время физические тренировки в режиме 3 раза в неделю увеличивают степень совершенства компенсаторных механизмов, которые обеспечивают поддержание гомеостаза при мышечной деятельности в анаэробных условиях. Данный режим ускоряет процесс развития тканевой адаптации, что позволяет выполнять мышечную работу даже при выраженных изменениях внутренней среды (накопление лактата, кетоновых тел, сдвиг pH, снижение содержания углеводов).

Существенное превышение уровня ирисина в крови, обнаруженное нами по окончании курса физических нагрузок, получаемых трижды в неделю, по сравнению с ежедневными нагрузками, является еще одним подтверждением вышеизложенной концепции. Определение уровня ирисина в крови можно рассматривать в качестве маркера, позволяющего мониторить оптимальный уровень физических нагрузок.

Таким образом, экспериментальным путем установлено, что для сохранения показателей системы гемостаза в пределах нормальных значений наиболее эффективным режимом физических нагрузок для крыс является принудительная ходьба в тредбане в течение 2 ч со скоростью 6–8 м/мин 3 раза в неделю на протяжении 30 дней. При этом данный режим тренировок сопровождается существенным повышением концентрации белка ирисина в плазме крови.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Барнаул) и ООО фирмы “Технология-Стандарт” (г. Барнаул).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – Ю.А.Б., И.И.Ш. Сбор данных – Ю.А.Б., И.Н.М., П.С.М., Д.С.П. Обработка данных – Ю.А.Б., В.М.Р., И.Н.М. Написание и редактирование манускрипта – Ю.А.Б., И.И.Ш., В.М.Р., И.Н.М.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Reimers CD, Knapp G, Reimers AK* (2012) Does physical activity increase life expectancy? A review of the literature. *J Aging Res* 12: 243–258. <https://doi.org/10.1155/2012/243958>
2. *Samitz G, Egger M, Zwahlen M* (2011) Domains of physical activity and all-cause mortality: systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. *Int J Epidemiol* 40(5): 1382–400. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr112>
3. *Warburton DE, Charlesworth S, Ivey A, Nettlefold L, Bredin SS* (2010) A systematic review of the evidence for Canada’s physical activity guidelines for adults. *Int J Behav Nutr Phys Act* 7: 39. <https://doi.org/10.1186/1479-5868-7-39>
4. *Pesce M, Ballerini P, Paolucci T, Puca I, Hosein Farzaei M, Patrino A* (2020) Irisin and Autophagy: First Update. *Int J Mol Sci* 21: 7587. <https://doi.org/10.3390/ijms21207587>
5. *Belyirani M, Okudan N, Kabak B, Erdogan M, Karanfilci M* (2016) The relationship between brain-derived neurotrophic factor, irisin and cognitive skills of endurance athletes. *Phys Sportsmed* 44(3): 290–296. <https://doi.org/10.1080/00913847.2016.1196125>
6. *Jeremic N, Chaturvedi P, Tyagi SC* (2017) Browning of white fat: novel insight into factors, mechanisms, and therapeutics. *J Cell Physiol* 232(1): 61–68.
7. *Rana KS, Arif M, Hill EJ, Aldred S, Nagel D, Nevill A, Randeva HS, Bailey CJ, Bellary S, Brown JE* (2014) Plasma irisin levels predict telomere length in healthy adults. *Age (Dordr)* 36(2): 995–1001. <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9620-9>
8. *Brailoiu E, Deliu E, Sporici RA, Brailoiu GC* (2015) Irisin evokes bradycardia by activating cardiac-projecting neurons of nucleus ambiguus. *Physiol Rep* 3(6): e12419. <https://doi.org/10.14814/phy2.12419>
9. *Salpea KD, Humphri SE* (2010) Telomere length in atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis* 209(1): 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.021>
10. *Vera E, Bernardes de Jesus B, Foronda M, Flores JM, Blasco MA* (2013) Telomerase reverse transcriptase synergizes with calorie restriction to increase health span and extend mouse longevity. *PLoS One* 8(1): e53760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053760>
11. *Хавинсон ВХ, Кузник БИ, Тарновская СИ, Линькова НС* (2015) Короткие пептиды и регулятор длины теломер гормон ирисин. *Бюлл эксп биол мед* 9: 332–336. [*Khavinson VKH, Kuznik BI, Tarnovskaya SI, Linkova NS* (2015) Short peptides and the telomere length regulator hormone irisin. *Bull Exp Biol Med* 9: 332–336. (In Russ)].
12. *Аронов ДМ* (2019) Возможная связь реабилитационных аэробных тренировок и увеличения длины теломер хромосом. *Рос кардиол журн* 24(3): 82–89. [*Aronov DM* (2019) Possible associations between recovery aerobic training and increasing the length of telomeres. *Russ J Cardiol* 24(3): 82–89 (In Russ)]. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2019-3-82-89>
13. *Кузник БИ, Давыдов СО, Степанов АВ, Морарь НВ* (2016) Влияние кинезитерапевтических процедур на содержание ирисина у женщин с заболеваниями сердечно сосудистой системы в зависимости от массы тела и гормонального статуса. *Патол физиол эксп терапия* 60(4): 47–51. [*Kuznik BI, Davydov SO, Stepanov A, Morar NV* (2016) The effect of kinesitherapy procedures on the content of irisin in women with diseases of the cardiovascular system, depending on body weight and hormonal status. *Patol Physiol Exp Therapy* 60(4): 47–51. (In Russ)].

14. Кузник БИ, Давыдов СО, Степанов АВ, Морарь НВ (2017) Изменение концентрации ирисина в крови больных гипертонической болезнью после физической нагрузки. Кардиология 57(4): 77–78. [Kuznik BI, Davydov SO, Stepanov AV, Morar NV (2017) Changes in the concentration of irisin in the blood of patients with hypertension after exercise. Kardiologiya 57(4): 77–78. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.18565/cardio.2017.4.77-78>
15. Wang S, Pan J (2016) Irisin ameliorates depressive-like behaviors in rats by regulating energy metabolism. Biochem Biophys Res Commun 474(1): 22–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.047>
16. Brenmoehl J, Albrecht E, Komolka K, Schering L, Langhammer M, Hoeflich A, Maak S (2014) Irisin is elevated in skeletal muscle and serum of mice immediately after acute exercise. Int J Biol Sci 10(3): 338–349.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.7972>
17. Von Känel R, Bellingrath BM, Kudielka S (2009) Association of vital exhaustion and depressive symptoms with changes in fibrin D-dimer to acute psychosocial stress. J Psychosom Res 67(1): 93–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2008.12.009>
18. Von Känel R, Kudielka BM, Haerberli A, Stutz M, Fischer JE, Patterson SM (2009) Prothrombotic changes with acute psychological stress: combined effect of hemoconcentration and genuine coagulation activation. Thromb Res 123(4): 622–630.  
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.05.014>
19. Lippi G, Maffulli N (2009) Biological influence of physical exercise on hemostasis. Semin Thromb Hemost 3(35): 269–276.  
<https://doi.org/10.1055/s-0029-1222605>
20. Шахматов ИИ, Носова МН, Вдовин ВМ, Бондарчук ЮА, Киселев ВИ (2011) Особенности реакции гемостаза при стрессе у лиц с разным уровнем тренированности. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 97(11): 1254–1261. [Shakhmatov II, Nosova MN, Vdovin VM, Bondarchuk Yu A, Kiselev VI (2011) Features of hemostasis under stress in individuals with different levels of fitness. Russ J Physiol 97 (11): 1254–1261. (In Russ)].
21. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. (2010) Council of the European Union, European Parliament. Offic J Eur Union 276: 33–80.
22. Тютрин ИИ, Удут ВВ, Шписман МН (2018) Низкочастотная пьезотромбоэластография в диагностике гемостазиологических расстройств: методическое руководство. Томск. Меднорд-Техника. [Tyutrin II, Udut VV, Shpisman MN (2018) Low-frequency piezothromboelastography in the diagnosis of hemostatic disorders: a methodological guide. Tomsk. Mednord-Technique. (In Russ)].
23. Тютрин ИИ, Удут ВВ (2016) Низкочастотная пьезотромбоэластография цельной крови: алгоритмы диагностики и коррекции гемостазиологических расстройств. Томск. Изд дом Томского гос универ [Tyutrin II, Udut VV (2016) low-Frequency piezothromboelastography of whole blood: algorithms for diagnostics and correction of hemostatic disorders. Tomsk. Publ House of Tomsk state Univer. (In Russ)].
24. Hemker H, Giesen P, Al Dieri R, de Smedt E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S (2003) Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. Pathophysiol Haemost Thromb 33: 4–15.  
<https://doi.org/10.1159/000071636>
25. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Beguin S (2006) Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. Thromb Haemost 96(5): 553–561.  
<https://doi.org/10.1160/th06-07-0408>
26. Кузник БИ, Чалисова НИ, Цыбиков НН, Линькова НС, Давыдов СО (2020) Стресс, старение и единая гуморальная защитная система организма. Эпигенетические механизмы регуляции. Успехи физиол наук 51(3): 51–68. [Kuznik BI, Chalisova NI, Tsybikov NN, Lin'kova NS, Davydov SO (2020) Stress, aging and united humoral protective system of the organism. epigenetic mechanisms of regulation. Adv Physiol Sci 51(3): 51–68. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S030117982002006X>
27. Хавинсон ВХ, Кузник БИ, Рыжак ГА, Линькова НС, Салль ТС, Чалисова НИ (2018) Ирисин, бетатрофин, сахарный диабет, ожирение и метаболический синдром. Эпигенетические механизмы регуляции. Успехи физиол наук 49(1): 72–86. [Khavinson VKH, Kuznik BI, Ryzhak GA, Lin'kova NS, Sall' TS, Chalisova NI (2018) Irisin, betatrophin, diabetes, obesity, and metabolic syndrome. Epigenetic mechanisms of regulation. Adv Physiol Sci 49(1): 72–86. (In Russ)].
28. Кузник БИ, Давыдов СО, Чалисова НИ (2019) Роль белков MANF, TIMP-2 и ирисина в старении организма. Успехи соврем биол 139(6): 540–552. [Kuznik BI, Davydov SO, Chalisova NI (2019) The role of MANF, TIMP-2 and irisin proteins in the aging of the body. Biol Bull Rev 139(6): 540–552. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.1134/S0042132419060048>
29. Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, Perron RM, Werner CD, Phan GO, Kammula US, Kebebew E, Pacak K, Chen KY, Celi FS (2014) Irisin and FGF21 are cold-induced

- endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab* 19(2): 302–309.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.017>
30. Кузник БИ, Давыдов СО, Степанов АВ (2018) Роль мышечного гормона ирисина в регуляции физиологических функций в условиях нормы и патологии. *Успехи физиол наук* 49(4): 59–80. [Kuznik BI, Davydov SO, Stepanov AV (2018) The role of the muscle hormone irisin in the regulation of physiological functions in normal and pathological conditions. *Adv Physiol Sci* 49(4): 59–80. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.7868/S0301179818040057>
  31. Murawska-Cialowicz E, Wolanski P, Zuwała-Jagiello J, Feito Y, Petr M, Kokstejn J, Stastny P, Golinski D (2020) Effect of HIIT with Tabata protocol on serum Irisin, physical performance, and body composition in men. *Int J Environ Res Public Health* 17: 3589.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph17103589>
  32. Tsuchiya Y, Ando D, Takamatsu K, Goto K (2015) Resistance exercise induces a greater irisin response than endurance exercise. *Metabolism* 64(9): 1042–1050.  
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.05.010>
  33. Ost M, Coleman V, Kasch J, Klaus S (2016) Regulation of myokine expression: Role of exercise and cellular stress. *Free Radic Biol Med* 98: 78–89.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.018>
  34. Aydin S, Aydin S, Kobat MA, Kalayci M, Eren MN, Yilmaz M, Kuloglu T, Gul E, Secen O, Alatas OD, Baydas A (2014) Decreased saliva/serum irisin concentrations in the acute myocardial infarction promising for being a new candidate biomarker for diagnosis of this pathology. *Peptides* 56: 141–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.04.002>

### The Effect of Different Modes of Exercise on the Hemostatic System and the Protein Concentration Irisin in the Experiment

Y. A. Bondarchuk<sup>a, b, \*</sup>, I. I. Shakhmatov<sup>a, b</sup>, I. N. Manaeva<sup>a, b</sup>, V. M. Raevskikh<sup>a</sup>, P. S. Marshalkina<sup>a</sup>, and D. A. Prokopets<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Altai State Medical University, Barnaul, Russia

<sup>b</sup>Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

\*e-mail: bondarchukb606@yandex.ru

Nowadays, research on non-drug methods to preserve health and increase life expectancy is considered relevant. It is a well-known fact that moderate physical activity has a direct impact on longevity. The hemostatic system plays a vital role in adaptation to physical activities, and changes in its indicators can negatively affect the cardiovascular system in response to physical stress. In 2012, the hormone irisin was discovered, which levels decrease with aging. Irisin is a protein synthesized during physical activity, which prevents aging-associated diseases, including hypertension, Parkinson's and Alzheimer's diseases. This research aims to develop an optimal regime of physical activity that would preserve the hemostasiological parameters within the normal range and lead to increased concentrations of irisin in blood. The studies were performed on young Wistar male rats. The experimental animals were subjected to physical exertion in the form of walking on a treadmill at a speed of 6–8 m/min for 30 days. The animals of the first experimental group were subjected to daily 2-hour physical activity periods. The animals of the second experimental group were subjected to 2-hour physical activity periods three times a week (Monday, Wednesday, Friday). It was discovered that in the first experimental group, with signs of hypercoagulation, the level of irisin increased by 130%. In the second experimental group, no signs of hypercoagulation were revealed. Herewith, irisin concentration increased by 225%. Thus, the most effective exercise regime for rats is coercive walking on a treadmill for 2 hours at a speed of 6–8 m/min three times a week for 30 days.

**Keywords:** physical activity, hemostatic system, piezotromboelastography, calibrated automated thrombography, irisin

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
СТАТЬИ

ОСОБЕННОСТИ МОТОРНОГО КОНТРОЛЯ ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ  
В ПАССИВНОМ ЭКЗОСКЕЛЕТЕ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

© 2021 г. Н. Д. Бабанов<sup>1, \*</sup>, О. В. Кубряк<sup>1</sup>, И. В. Меркурьев<sup>2</sup>, И. А. Орлов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина,  
Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский университет “МЭИ”, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН, Москва, Россия

\*E-mail: n.babanov@nphys.ru

Поступила в редакцию 04.03.2021 г.

После доработки 12.07.2021 г.

Принята к публикации 13.07.2021 г.

В наблюдении на 24 здоровых молодых мужчинах-добровольцах исследовалось влияние пассивного экзоскелета нижних конечностей на моторный контроль. В экзоскелете изучалась поза, представляющая собой промежуточное состояние между стоянием и сидением – “гибридная поза”. Анализировались данные поверхностной электромиографии от *Musculus quadriceps femoris* и *Musculus tibialis anterior* обеих ног, данные от силовой платформы и параметры выполнения инструкции в задаче с визуальной обратной связью по опорной реакции при поочередном манипулировании обеими руками. В исследовании показано, что одним из влияющих условий на параметры моторного контроля в “гибридной позе” является преобладающий тип сенсорной организации обычной вертикальной позы. Отличия “гибридной позы” в описанных условиях от простой вертикальной позы более контрастно выявлялись при ритмичном целенаправленном раскачивании добровольцев в сагиттальной и фронтальной плоскостях. Наблюдалось перераспределение активности исследуемых мышц в зависимости от направления движения. Показаны различия в амплитуде раскачиваний тела, выраженные в повышении объема движений в экзоскелете в сагиттальной плоскости и понижении во фронтальной плоскости по сравнению с обычной вертикальной позой. Введено деление на подгруппы с большей ролью зрения в регуляции вертикальной позы (“визуалы”) и меньшей (“проприоцептики”). Показано, что во фронтальной плоскости условная подгруппа “проприоцептики” демонстрировала большую амплитуду раскачивания тела в экзоскелете по сравнению с подгруппой “визуалы”. Управление верхними конечностями (обусловленное инструкцией надавливание на неподвижную рукоять) не зависело от особенностей сенсорной организации позы в условиях заданного визуального контроля и отличалось по сложности манипулирования (по показателям стабиллометрии) в вариантах вертикальной позы в экзоскелете и без при одинаковой результативности.

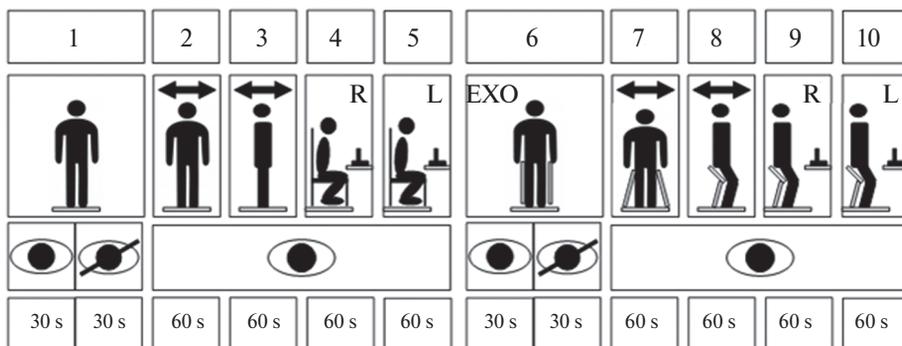
**Ключевые слова:** вертикальная поза, гибридная поза, сенсорное обеспечение позы, стабиллометрия, опорные реакции, электромиография, экзоскелет, двигательно-когнитивные задачи, моторные тесты

DOI: 10.31857/S0869813921090089

При выполнении привычных движений руками или просто при стоянии в вертикальной позе человек совершает “стандартный целостный акт” [1]. При облачении в экзоскелет такой естественный “стандартный акт” движения модифициру-

ется. На практике хорошо известны отличия в эффективности последующего движения человека в зависимости от исходной позы. Например, контрастные по внешнему виду и последующей эффективности действия, исходные позиции в легкой атлетике – это “высокий” и “низкий” старт [2]. Иными словами, исходная конфигурация, поза тела связаны с характеристиками афферентации, сенсорного обеспечения дальнейшего движения и, в итоге, его особенностями. В этой связи следует вспомнить работу 1949 г. М.Ф. Чепелюгиной, аспирантки П.К. Анохина, которая на примере известного опыта с лягушкой, где оценивалось изменение локомоции при перерезании дорсальных корешков в различных отделах спинного мозга, давал следующее объяснение полученным результатам: “...афферентные функции функциональной системы динамически меняются и различно распределяются по системе в зависимости от степени ее автоматизации. Эта автоматизация является следствием того, что при прыжке и других формах движения лягушке приходится преодолевать совершенно стандартные препятствия в виде веса конечностей и веса своего тела. Поэтому вся функциональная система прыжка, например, стимулируется с весьма ограниченного количества рецепторных образований. В то же время сам прыжок как целостный акт, формируясь в результате стандартных разрядов среднего мозга, уже не требует афферентации, развиваясь как стандартный целостный акт” [1]. Здесь актуальность полученных нами результатов на примере использования экзоскелета связана также с исследованиями регуляции вертикальной позы человека, например, применительно к распространенной сегодня модели “перевернутого маятника”, суть которой заключается в системе с центром масс, расположенном выше точки опоры и по своей природе являющимся неустойчивым, из-за чего возникает необходимость в постоянном контроле баланса тела через петлю обратной связи по разнице в суставных и “опрокидывающих” моментах сил [3, 4]. Полученные результаты данного исследования могут быть использованы в решении обратной задачи динамики с использованием теоретических моделей движения человека аналогичной модели “перевернутого маятника” [5]. Также актуальность данного исследования связывается с исследованиями влияний дополнительной сенсорной информации, в том числе тактильных контактов руки, на поддержание вертикальной позы (например, [6]).

Специфическая “гибридная поза” или “стоячее сидение”, обусловленное экзоскелетом [7], представляет особый интерес для исследователя, так как отличается и от обычного стояния, и от обычного сидения с присущими им “стандартными” афферентными условиями [8]. Формирование подобных нетипичных поз у человека связано с заменой естественной синергии мышц ног (например, передней большеберцовой, камбаловидной и двуглавой мышцы бедра) искусственной с существенной модификацией паттерна движения и значительными адаптационными перестройками механизмов постурального контроля, обеспечивающих защиту организма от перегрузки или травм. При этом малая исследованность вопроса вместе с расширяющейся популярностью экзоскелетов [9, 10] дополнительно придает теме практическую значимость. Изучение возможных взаимосвязей между оцениваемыми количественными параметрами обеспечения моторного контроля в “гибридных” позах может предоставить базу для системной оценки функционального состояния человека, а также “физиологического качества” разрабатываемых экзоскелетов. В данной работе ставилась цель исследовать особенности моторного контроля добровольцев в экзоскелете, в том числе, провести сравнение выполнения обусловленных инструкцией целенаправленных надавливаний кистями рук на силовой джойстик по типу ранее описанного [11, 12] в “гибридной позе” и, сидя на табурете, так как оценивался вклад “новых” афферентных сигналов при выполнении моторной задачи, чаще выполнимой именно сидя.



**Рис. 1.** Общая схема процедуры наблюдения.

Сокращения: R – правая рука, L – левая рука, EXO – экзоскелет, sec – длительность этапа в секундах.

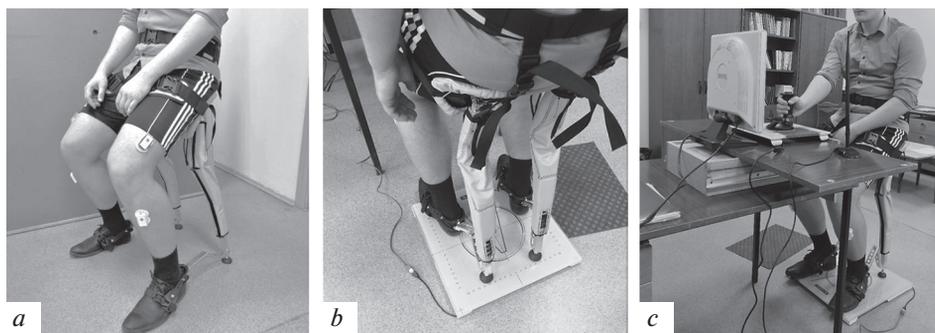
Цифрами обозначен номер этапа исследования. Пояснения в тексте.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Добровольцы и условия.** Наблюдение проводилось на 24-х условно здоровых добровольцах. Соблюдались современные этические нормы согласно требованиям локальной этической комиссии ФГБНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации и ГОСТ Р 56509–2015 “Услуги населению. Надлежащая практика гуманитарных исследований”. Размер выборки определялся, исходя из актуальных представлений об обеспечении достоверности результатов в наблюдениях с повторяющимися измерениями (например, [13]). Критерии включения: условно здоровые праворукие добровольцы-мужчины от 20 до 25 лет, не имеющие в анамнезе выявленных заболеваний суставов, мышц, переломов конечностей, черепно-мозговых травм, вестибулопатии, косоглазия. Никто из испытуемых не являлся профессиональным спортсменом. Курение перед наблюдением, чувство голода или жажда, некомфортные состояния исключались условиями наблюдения.

**Процедура.** Наблюдение проводилось в одну серию после заполнения форм информированного согласия, инструктажа и предварительного обучения управлению экзоскелетом и джойстиком, проведения необходимой подготовки. Наблюдение проводилось согласно этапам на рис. 1, без рандомизации для исключения влияния усталости (напряженная поза полуприседа) на дальнейшие пробы. Также исключен вариант выполнения процедуры с джойстиком в обычной вертикальной стойке, так как так называемая “гибридная поза” чаще всего применяется для замены обычного сидения.

Процедура включала два условных блока последовательных заданий. Первый блок – этапы с 1-го по 5-й, выполняемые испытуемым без экзоскелета, а второй – этапы с 6-го по 10-й проводились в экзоскелете. Этапы наблюдения обозначены цифрами на рис. 1. *Первый этап* включал 2 фазы – обычное стояние добровольца в вертикальной позе, голова прямо, руки свободно вдоль туловища, с открытыми и закрытыми глазами, по 30 с. *На втором этапе* доброволец под звук метронома раскачивался во фронтальной плоскости (с правой ноги на левую) без отрыва ступней от платформы. Требовалось производить максимально комфортные для испытуемого по амплитуде и точные в ответ на звук движения в задаваемом метрономом медленном ритме 45 уд./мин (0.75 Гц), выбранном для увеличения внимания к выполнению достаточно сложного задания – раскачивания тела в комфортном диапазоне без отрыва ступней от платформы и взмахивания руками, требующего определенного контроля со стороны испытуемого (по аналогии с известными подходами [14]). *Третий этап* – похож на второй, но движения выполнялись в сагит-



**Рис. 2.** Экипирование (а) и фрагменты наблюдения в экзоскелете на силовой платформе с закрепленными на ногах электромиографическими датчиками и при выполнении задания с помощью силового джойстика (b, c).

тальной плоскости (вперед — назад). На четвертом и пятом этапах производилось поочередное управление силовым джойстиком правой и левой рукой из положения, сидя на стандартном четырехном табурете, установленном на силовую платформу. С шестого по десятый этап последовательно выполнялись действия, сходные с этапами с первого по пятый, но испытуемый экипировался в экзоскелет (рис. 2a). На рис. 2b показано расположение испытуемого в экзоскелете на силовой платформе, а на 2c — выполнение инструкции с силовым джойстиком. Угол сгиба ног испытуемого в экзоскелете составлял  $120^\circ$  и задавался механизмом фиксации заданного положения. Длительность каждого этапа и отдых между этапами составляли 1 мин. Добровольцы были обуты в собственную удобную для них обувь с твердой, тонкой подошвой (рис. 2).

**Оборудование и техническое обеспечение.** Применялся комплекс беспроводного мониторинга электрофизиологических сигналов “Колибри” (Нейротех, Россия, регистрационное свидетельство Министерства Здравоохранения РФ РЗН 2016/5020) — четыре нательных датчика с одноразовыми сменными липкими электродами, передающие регистрируемые значения по радиоканалу в персональный компьютер со штатной программой “Нейротех миография SPORT”. Использовалось мобильное приложение “Классический метроном” (Netigen, Польша), две силовые платформы ST-150 с одним джойстиком SDB-17 с штатным программным обеспечением STPL (Мера-ТСП, Россия, Свидетельство о регистрации средства измерений в РФ RU.C.39.004.A N 41201, регистрационное свидетельство Министерства Здравоохранения РФ ФСР 2010/07900, коды GMDN: 43114 Balance/mobility management system platform, 43115 Balance/mobility management system application software). Экзоскелет представлял собой двухзвенное механическое устройство без активных движителей и аккумуляторов — рис. 2. Первое звено — в области голеностопного сустава (нижнее звено), второе — в области коленного сустава (верхнее звено). Для ограничения высоты стойки оператора в области коленного шарнира установлен запорный механизм, фиксирующий положение экзоскелета. При выполнении соответствующих этапов испытуемые сидели на стандартном (ГОСТ 13025.2–85) деревянном четырехном табурете.

Силовая платформа с силовым (неподвижным, реагирующим на прилагаемую силу) джойстиком [11] для выполнения этапов 4, 5, 9 и 10 по схеме на рис. 1 устанавливалась на столе перед экраном визуальной обратной связи. Задача управления силовым джойстиком требовала наведения метки давления рукой на силовую платформу под джойстиком из стартового круга на появляющиеся по периметру круглые “мишени”, где было необходимо удерживать метку на “мишени” до ее ис-

чезновения и возвращать метку давлением рукой в стартовый круг для появления новой “мишени”. Задание регулировалось штатной для силовой платформы программой STPL в режиме “Динамическая проба”, аналогично ранее описанному [11]. Кисть руки располагалась на рукояти джойстика стандартным хватом, задаваемым формой рукояти. При этом управляющая рука испытуемого не опиралась локтем на стол, а вторая рука свободно лежала на колене (рис. 2С).

Команды подавались встроенными в управляющую программу стандартными голосовыми фразами. Для предотвращения влияния возможной ориентировочной реакции на суммарные расчетные показатели до начала выполнения задания добровольцем проходило 8 с в заданных условиях этапа позы – по настройкам управляющей программы. Область прикрепления электромиографических датчиков определялась по специализированному атласу [15]. Регистрировались активность четырехглавой (*Musculus quadriceps femoris* – MQF) и передней большеберцовой (*Musculus tibialis anterior* – МТА) мышц правой и левой ноги. Выбор данных мышц связан с их возможной активностью в “гибридных позах” [16], а именно вовлечении MQF при поддержании статической позы в полуприсяде и МТА, вовлеченной для разгибания стопы и поддержании статической позы вертикально стоя. Проводилась одновременная регистрация поверхностной электромиографии (ЭМГ) и измерение координат общего центра давления (ЦД) на силовой платформе и на двух силовых платформах для этапов 4, 5, 9 и 10 (рис. 1).

**Показатели.** По данным от силовой платформы оценивался показатель “*мощность статокинезиограммы*” ( $P$ , мДж/с), рассчитываемый в штатной программе STPL по общей формуле:

$$P = \frac{m}{t} \sum_{i=1}^n \frac{|Vx_{i+1}^2 - Vx_i^2| + |Vy_{i+1}^2 - Vy_i^2|}{2},$$

где показатель равен значениям, вычисленным на каждом элементарном отрезке за общее время записи. Параметр связан исключительно с характеристикой статокинезиограммы и рассчитывается с использованием измеренных значений координат общего центра давления на плоскость опоры [17]. Данный “энергетический” подход имеет различные прототипы в исследованиях моторики (например, [18]) и обладает большей точностью передачи информации о форме статокинезиограммы, чем, например показатель “длина” или “средняя скорость” в измерениях на силовой платформе [17]. *Максимальная амплитуда движения ЦД* в фронтальной ( $\text{Max}X$ , мм) и сагиттальной ( $\text{Max}Y$ , мм) плоскости. *Площадь статокинезиограммы* ( $S$ , мм<sup>2</sup>) – площадь эллипса, ограничивающая 95% точек траектории ЦД. Также показатель  $P$  применялся в качестве оценки эффективности выполнения целенаправленного движения рукой – как *критерий энергоэффективности управления* (мДж/с) при использовании второй стабиллоплатформы с зафиксированным на ней силовым джойстиком. Был включен программный фильтр высоких частот (>7 Гц) для предотвращения влияния возможных внешних вибраций и сетевых шумов на измерения. *Сила давления* (Н) – это величина, отображающая нагрузку на платформу, создаваемую рукой при управлении джойстиком. *Внешний результат* (Гр, с) – среднее значение периода времени отработки цельного фрагмента пробы “Динамическая проба”, суть которой заключается в перемещении управляемой метки ЦД от начального положения в центре на появившуюся “мишень”, фиксации метки до исчезновения мишени и возвращении управляемой метки обратно в центр.

По данным от поверхностной электромиографии производилась оценка силовых качеств мышцы, определяемая как площадь интегральной огибающей электромиограммы в штатной программе (мкВ с). Для сравнений вклада зрительного контроля на поддержание стабильности вертикальной позы у добровольцев вычислялось значение изменения величины показателя  $P$  в процентах между фазой с от-

крытыми и закрытыми глазами (фазы 1 и 2 в этапе 1 и 6, рис. 1) – как оценка “сенсорного профиля” (%) по формуле:

$$\Delta P = \frac{P_i^{\text{закрытые глаза}} \times 100\%}{P_i^{\text{открытые глаза}}} - 100\%.$$

Принимается точка зрения, что чем больше значение, тем больший вклад зрительного контроля в поддержание позы.

Оценка асимметрии (между правой и левой ногой) электромиографических параметров исследуемых мышц проводилась по следующей формуле:

$$k = \frac{\text{MQF (прав)} + \text{МТА (прав)}}{\text{MQF (лев)} + \text{МТА (лев)}},$$

где  $k$  – коэффициент асимметрии, MQF – четырехглавая мышца бедра (*Musculus quadriceps femoris*) и МТА – передняя большеберцовая мышца (*Musculus tibialis anterior*), правой и левой ноги соответственно. Определялась активность каждой исследуемой мышцы в процессе поддержания позы по сумме значений интегрального показателя для левой и правой ноги.

**Статистический анализ.** Для всех этапов применялась проверка типа распределения – одновыборочный критерий типа Колмогорова-Смирнова. Применялся непараметрический критерий Фридмана (аналог дисперсионного анализа ANOVA) с апостериорным тестом Бонферрони для значений площади интегральной огибающей электромиограммы мышц у подгрупп в каждой отдельно взятой фазе этапа 1 и 6; критерия энергоэффективности управления в этапах 4, 5 и 9, 10.

Для оценки различия между зависимыми парными выборками применялся непараметрический критерий Уилкоксона между: этапами 1 и 6 для показателей оценки “сенсорного профиля”; фазами 1 и 2 в этапе 1 и между фазами 1 и 2 в этапе 6 для значения площади интегральной огибающей электромиограммы мышц; для значений площади интегральной огибающей электромиограммы мышц между подгруппами в каждой отдельно взятой фазе этапа 1 и 6; для показателей максимальной амплитуды движения ЦД, площади статокинезиограмм  $S$ , мощности статокинезиограммы  $P$ , а также значениями  $P$  в сагиттальных и фронтальных проекциях между этапами 2 и 7, 3 и 8; при сравнении показателей между положением сидя на табурете и в экзоскелете в этапах 4 и 9, 5 и 10, а также их сравнение в подгруппах интегральной огибающей электромиограммы мышц и “коэффициента асимметрии”.

Для оценки различий между двумя независимыми выборками применялся непараметрический  $U$ -критерий Манна–Уитни между: фазами 1 и 2 в этапе 1 в группе для значения площади интегральной огибающей электромиограммы мышц левой и правой ноги; этапами 4 и 5, 9 и 10 в группе при сравнении показателей площади статокинезиограмм  $S$ , критерия энергоэффективности управления джойстиком, мощности статокинезиограммы  $P$ , а также значений  $P$  в сагиттальных и фронтальных проекциях, показателями внешнего результата  $Tr$ .

Применялась оценка корреляции с помощью критерия Спирмена при манипулировании джойстиком в этапах 4, 5, 9 и 10 между площадями интегральной огибающей электромиограммы исследуемых групп мышц. Сила связи устанавливалась по шкале Чеддока.

Принятый уровень значимости  $\alpha = 0.05$ . Вычисления и подготовка таблиц – в стандартных программах MS Excel 2010 и IBM SPSS Statistics 17.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Распределение добровольцев по вкладу зрения в контроль заданной позы (стабилометрия).** Значения показателя ЦД в первом этапе – простое вертикальное стояние с открытыми глазами имеют тип нормального распределения. Среднее значение по-

ложения координаты ЦД в фронтальной плоскости составляет 1 мм. Таким образом, вводится допущение, что испытуемые стоят ровно симметрично относительно начала координат. В спокойном свободном стоянии с открытыми глазами (фаза 1, этап 1 на рис. 1) показатель мощности статокинезиограммы  $P$  варьировался у добровольцев от 32 до 99 мДж/с, при закрытии глаз (фаза 2, этап 1) — от 67 до 146 мДж/с. При использовании экзоскелета в первой фазе этапа показатель мощности статокинезиограммы  $P_6$  варьировался от 33 до 103 мДж/с; во второй фазе этапа 6 (глаза закрыты) — от 41 до 144 мДж/с. Значение оценки “сенсорного профиля”, характеризующей вклад зрения в регуляцию вертикальной позы согласно принятой методике, в этапе 1 менялось от 36 до 548%, значение медианы — 45%. За условную границу, отличающую испытуемых с большей ролью зрения в регуляции вертикальной позы от меньшей, была принята медиана. Добровольцы с показателями ниже медианы, условно “группа-А (проприоцептики)” — значение медианы в подгруппе 17%. Подгруппа с показателями выше групповой медианы, условно “группа-Б (визуалы)” — значение медианы 143%.

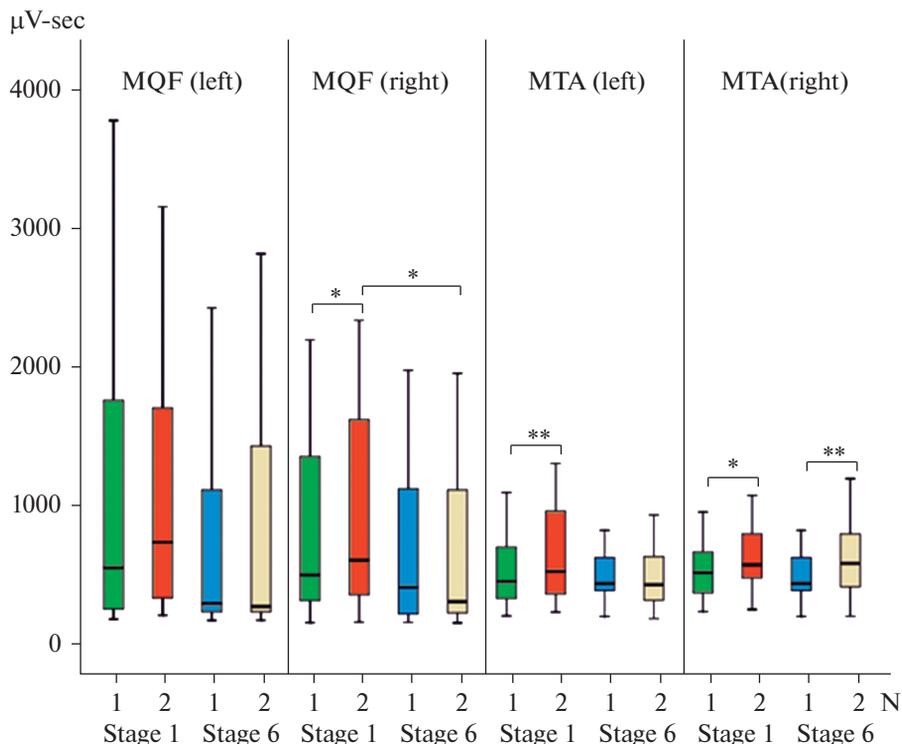
Аналогично оценивался вклад зрительного контроля на стабильность позы испытуемых в экзоскелете (этап 6 на рис. 1). Значение оценки “сенсорного профиля” изменялось от -52 до 268%. Медиана групповых значений равна 64%. Подгруппа ниже медианы условно названа “проприоцептики-Э”, отмечая наличие экзоскелета, выше медианы — “визуалы-Э” соответственно.

Применен непараметрический критерий Уилкоксона для показателей оценок “сенсорного профиля” между этапами 1 и 6. Данные показатели значимо не различались ( $p = 0.493$ ). У 79% испытуемых не произошло перехода из одной подгруппы в другую (выше или ниже медианы). Таким образом, было принято, что вся выборка испытуемых преимущественно сохраняла исходную оценку “сенсорного профиля” и при использовании экзоскелета. В этой связи, далее в описании применялось деление на подгруппы “проприоцептики” и “визуалы” по показателям этапа 1 (рис. 1).

**Распределение добровольцев по вкладу зрения в контроль заданной позы (электромиография).** Применялся непараметрический критерий Манна-Уитни для оценки силовых качеств мышц левой и правой ноги. Значимые различия отсутствовали, таким образом, характер показателя для левой и правой ноги в мышцах квадрицепсах бедра и передних большеберцовых мышцах не отличался. Групповые значения площади интегральной огибающей электромиограммы исследуемых мышц в первой и второй фазах этапа 1 представлены на рис. 3.

Увеличивался показатель площади интегральной огибающей электромиограммы в фазе с закрытыми глазами в пробе 1 (обычное стояние) в сравнении с фазой с открытыми глазами для всех групп мышц ( $p < 0.05$ ), кроме MQF (левая) ( $p = 0.104$ ): для MQF (правая) на 21%; для МТА (левая) на 16%; для МТА (правая) на 11%. При обычном стоянии в вертикальной позе в экзоскелете в фазе с закрытыми глазами (этап 6) значение площади интегральной огибающей электромиограммы увеличивалось только для правой передней большеберцовой мышцы (МТА) на 32% ( $p < 0.01$ ) в сравнении с фазой с открытыми глазами.

У подгрупп в значениях показателя площади интегральной огибающей электромиограммы рассматриваемых групп мышц в первой и второй фазах при обычном стоянии (этап 1) значимых различий не установлено. При использовании экзоскелета (этап 6) также отсутствовали значимые различия между подгруппами в первой и второй фазах. Также проводилась оценка зрительного контроля в обеспечении вертикальной позы добровольцев по комплексному показателю асимметрии согласно вышеприведенному описанию. Получены индивидуальные показатели “коэффициента асимметрии” напряжения мышц для каждой из фаз. Статистически значимые различия в выборке были установлены только в том случае, когда испытуемые стояли в надетом экзоскелете с закрытыми глазами (фаза 2, этап 6): у подгруппы “проприоцептики” асимметрия выражена в напряжении по правой стороне на 17%, группа “визуалы” — по левой стороне ( $p = 0.045$ ) на 16%.



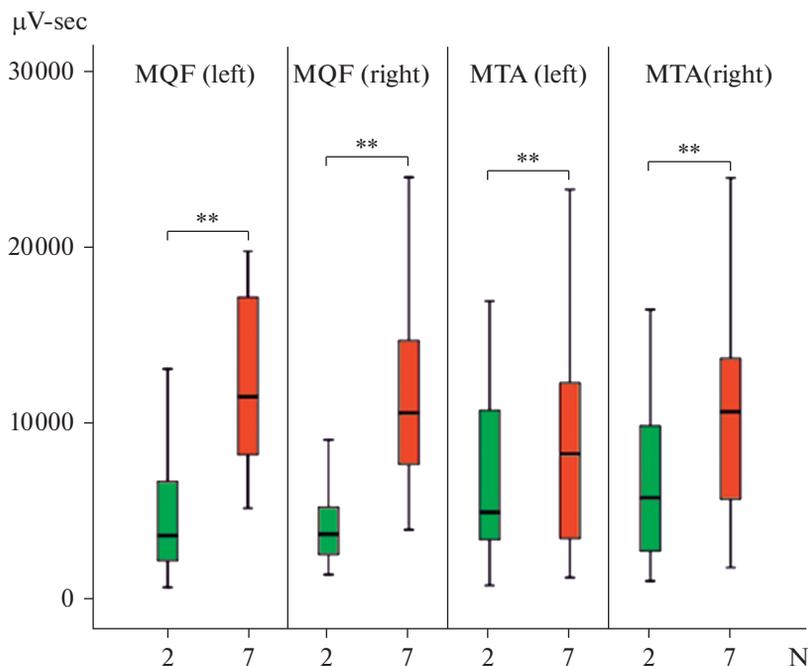
**Рис. 3.** “Box Plot” – медиана и квантили (отмечены прямоугольником с меткой), выбросы площади интегральной огибающей электромиограммы исследуемых мышц ( $\mu\text{V sec}$ ) в группе добровольцев. Вертикальными линиями отделены группы исследуемых мышц, цифрами на горизонтальной оси обозначены порядковые номера фазы с открытыми (1) и закрытыми (2) глазами в этапах 1 (обычная вертикальная поза) и 6 (обычная вертикальная поза в экзоскелете). \* – статистическая значимость различий при  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$  по критерию Уилкоксона.

### Контроль позы при ритмическом фронтальном раскачивании (стабилометрия).

Групповые значения максимальной амплитуды движения ЦД MaxX во время раскачивания тела в фронтальной плоскости (этап 2) варьировались от 86 до 112 мм, в экзоскелете (этап 7) от 70 до 98 мм. При поддержании “гибридной позы” в экзоскелете показатель снижался на 19% ( $p = 0.007$ ).

Сравнение мощности статокинезиограммы R проводилось между этапами раскачивания тела при обычном стоянии в вертикальной позе (этап 2) и в “гибридной позе” в экзоскелете (этап 7). Значимые различия между этапами 2 и 7 отсутствовали ( $p = 0.219$ , применен непараметрический критерий Уилкоксона). Дополнительно сравнивались показатели мощности статокинезиограммы в сагиттальной и фронтальной проекциях. При раскачивании тела во фронтальной проекции в экзоскелете значения показателя снижались на 30% ( $p = 0.032$ ), а в сагиттальной проекции увеличивались в 3 раза ( $p < 0.001$ ).

С помощью непараметрического критерия Уилкоксона сравнивались площади статокинезиограмм S в подгруппах. При использовании экзоскелета в подгруппе “визуалы” площадь статокинезиограммы уменьшалась в 2 раза ( $p = 0.024$ ) по сравнению с подгруппой “проприоцептики”. Значимые различия у подгрупп при раскачивании тела в обычном стоянии в фронтальной плоскости без экзоскелета отсутствовали.



**Рис. 4.** “Box Plot” – медиана и квантили (отмечены прямоугольником с меткой), выбросы площади интегральной огибающей электромиограммы исследуемых мышц ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ ) в группе добровольцев. Вертикальными линиями отделены группы исследуемых мышц, цифрами на горизонтальной оси обозначены порядковые номера этапов с раскачиванием во фронтальной плоскости согласно описанной выше методике: 2 – раскачивание в обычной вертикальной позе, 7 – раскачивание, сидя в экзоскелете. \*\*  $p < 0.01$  по критерию Уилкоксона.

#### **Контроль позы при ритмическом фронтальном раскачивании (электромиография).**

Групповые значения площади интегральной огибающей электромиограммы мышц в этапах 2 и 7 представлены на рис. 4.

При использовании экзоскелета (этап 7) площади интегральной огибающей электромиограммы увеличилась: для MQF (левая) в 3 раза ( $p < 0.001$ ); для MQF (правая) в 3 раза ( $p < 0.001$ ); для MTA (правая) в 2 раза ( $p < 0.001$ ). Применен непараметрический критерий Уилкоксона. Для MTA (левая) значимые различия отсутствовали ( $p = 0.086$ ).

Площади интегральных огибающих электромиограмм исследуемых групп мышц в подгруппах значимо не различались. Аналогично значимые различия мощности статокинезиограммы в подгруппах отсутствовали. Статистически значимых различий в показателях “коэффициента асимметрии” напряжения исследуемых групп мышц в выборке и в подгруппах не установлено.

**Контроль позы при ритмическом сагиттальном раскачивании (стабилометрия).** При раскачивании тела при вертикальном стоянии (этап 3) в сагиттальной плоскости групповые значения максимальной амплитуды движения ЦД MaxY варьировались от 79 до 93 мм, в экзоскелете (этап 8) – от 83 до 124 мм. Во время раскачивания в экзоскелете (этап 8) показатель увеличивался на 6% ( $p = 0.024$ , применен непараметрический критерий Уилкоксона).

Мощность статокинезиограммы P в группе варьировалась от 3918 до 9148 мДж/с в этапе 3, в этапе 8 от 2856 до 9191 мДж/с. При сагиттальном раскачивании в эк-

зоскелете показатель уменьшался на 30% ( $p = 0.011$ , применен непараметрический критерий Уилкоксона).

Дополнительно были сравнены показатели мощности статокинезиограммы в сагиттальной и фронтальной проекциях. В сагиттальной проекции при использовании экзоскелета показатель снизился на 39% ( $p = 0.005$ , применен непараметрический критерий Уилкоксона). В фронтальной плоскости значимые различия отсутствовали.

**Контроль позы при ритмическом сагиттальном раскачивании (электромиография).** Групповые значения площади интегральной огибающей электромиограммы исследуемых групп мышц в этапах 3 и 8 представлены на рис. 5.

Для анализа был применен непараметрический критерий Уилкоксона. В экзоскелете (этап 8) площади интегральной огибающей электромиограммы передних большеберцовых мышц (МТА) обеих ног снизились на 60% ( $p < 0.01$ ). Для четырехглавой мышцы бедра (MQF) правой и левой ноги значимые различия отсутствовали.

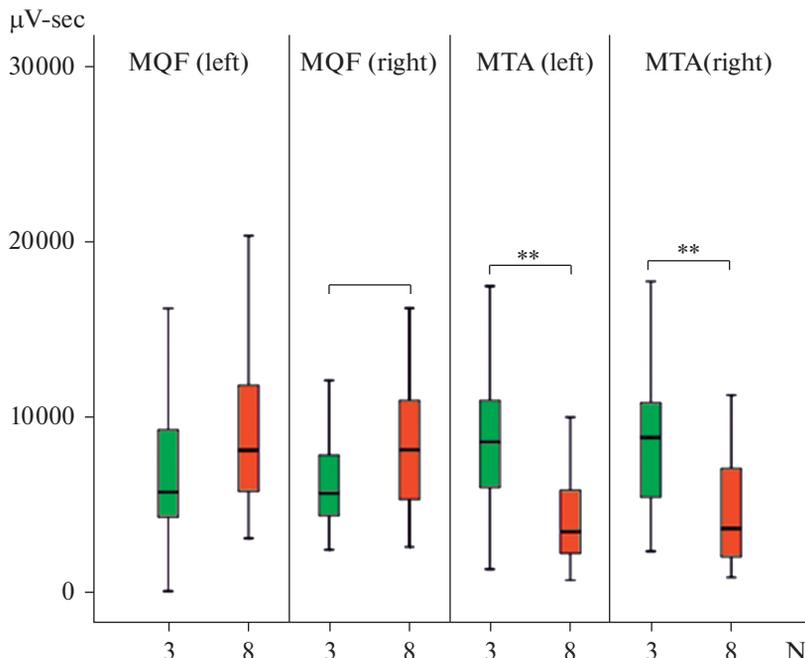
При сравнении подгрупп “визуалы” и “проприоцептики” значимые различия были обнаружены только для площади интегральной огибающей электромиограммы левой передней большеберцовой мышцы (МТА): в экзоскелете показатель снизился у подгруппы “визуалы” на 20% ( $p = 0.017$ ). Также статистически значимые различия в выборке были установлены при раскачивании тела без экзоскелета в этапе 3 ( $p = 0.045$ ): у подгруппы “проприоцептики” асимметрия выражена в напряжении по правой ноге на 5%, группа “визуалы” – по левой ноге на 3%. Различий в площадях статокинезиограмм не обнаружено. Аналогично сравнены показатели мощности статокинезиограммы R у подгрупп – значимых различий не установлено.

#### *Внешние результаты – целенаправленные нажатия рукой*

Был проведен однофакторный дисперсионный анализ. Принималась альтернативная гипотеза при анализе критерия энергоэффективности управления, исходя из критерия Фишера ( $F = 3.288$ ;  $p = 0.024$ ). Для остальных параметров значимых различий не обнаружено. Апостериорный тест Бонферрони показывал увеличение показателя критерия энергоэффективности управления при управлении левой рукой в экзоскелете (этап 10) на 36% ( $p = 0.048$ ) по сравнению с позицией, сидя на табурете (этап 5). Наблюдалось незначительное увеличение показателя при управлении правой рукой в экзоскелете ( $p = 0.059$ , этап 9) при сравнении с показателем, сидя на табурете (этап 4). По остальным показателям значимых различий не обнаружено. Аналогично в положении в экзоскелете (этапы 9 и 10) по рассматриваемым показателям значимых различий не обнаружено.

**Параметры моторного контроля при целенаправленных нажатиях рукой в положении сидя и в “гибридной позе”.** При прохождении, сидя на табурете, показатели площадей статокинезиограмм S платформы под табуретом варьировались от 32 до 100 мм<sup>2</sup> при управлении правой рукой и от 42 до 125 мм<sup>2</sup> при управлении левой рукой. Значимые различия между управлением правой и левой рукой, сидя на табурете, отсутствовали (непараметрический U-критерий Манна–Уитни). В экзоскелете значения показателя варьировались от 93 до 223 мм<sup>2</sup> при управлении правой рукой (этап 9), при управлении левой (этап 10) – от 84 до 242 мм<sup>2</sup>. Значимые различия между управлением правой и левой рукой в экзоскелете, также отсутствовали (непараметрический U-критерий Манна–Уитни).

Мощность статокинезиограммы R, сидя на , варьировалась от 83 до 212 мДж/с при управлении левой рукой (этап 4) и от 81 до 230 мДж/с при управлении правой рукой (этап 5). При смене рук значимых различий не установлено (непараметрический U-критерий Манна–Уитни). В экзоскелете в этапе 9 – от 55 до 150 мДж/с, в этапе 10 – от 41 до 124 мДж/с, аналогично значимых различий не установлено (непараметрический U-критерий Манна–Уитни).



**Рис. 5.** “Box Plot” – медиана и квартили (отмечены прямоугольником с меткой), выбросы площади интегральных огибающих электромиограмм мышц ( $\mu\text{V sec}$ ) в группе добровольцев.

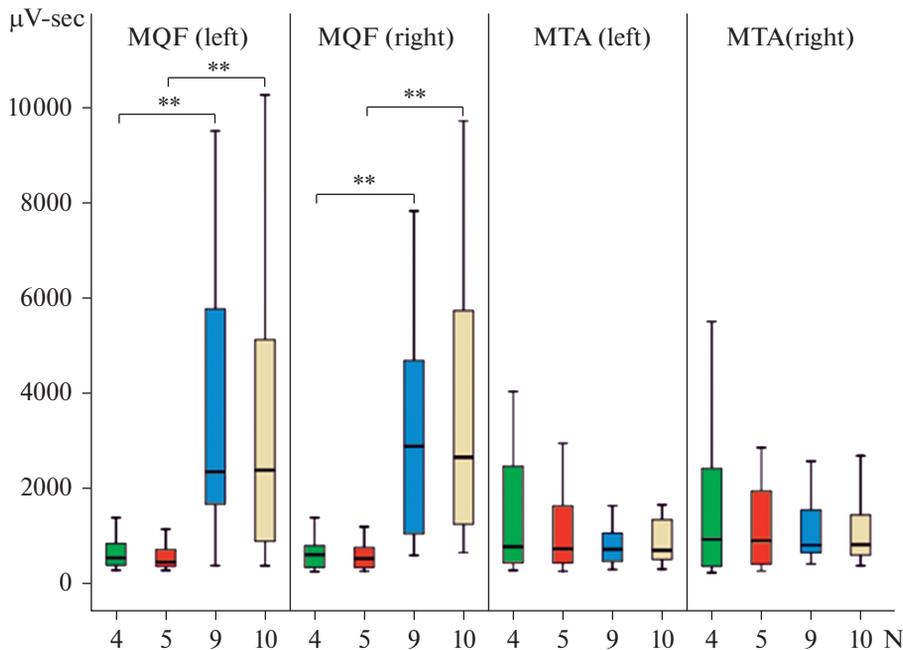
Вертикальными линиями отделены группы исследуемых мышц, цифрами на горизонтальной оси обозначены порядковые номера этапов с раскачиванием в сагиттальной плоскости согласно описанной выше методике: 3 – раскачивание в обычной вертикальной позе, 8 – раскачивание, сидя в экзоскелете. \*\* – статистическая значимость  $p < 0.01$  по критерию Уилкоксона.

Групповые значения площади интегральной огибающей электромиограммы мышц в этапах 4, 5 и 9, 10 представлены на рис. 6.

При использовании экзоскелета во время управления правой рукой площадь статокинезиограммы увеличилась в 2.4 раза ( $p < 0.001$ ); мощность статокинезиограммы уменьшилась на 6% ( $p = 0.040$ ); площадь интегральной огибающей электромиограммы в мышцах бедра увеличилась: у MQF (левая) в 4.1 раза ( $p < 0.01$ ), у MQF (правая) в 4.5 раза ( $p < 0.01$ ). Для мышц голени (MTA) значимых различий не установлено. Во время управления левой рукой в экзоскелете площадь статокинезиограммы увеличилась на 50% ( $p = 0.001$ ); показатель мощности статокинезиограммы уменьшился на 40% ( $p = 0.003$ ); площадь интегральной огибающей электромиограммы в мышцах бедра увеличилась: у MQF (левая) в 4.8 раза ( $p < 0.01$ ), у MQF (правая) в 4.7 раза ( $p < 0.01$ ). Для мышц голени (MTA) значимых различий не установлено.

Сравнение показателей и коэффициента асимметрии у подгрупп значимых различий не дало.

Отдельно были оценены показатели мощности статокинезиограммы у платформы в основании во время управления джойстиком, сидя на табурете (этапы 5, 6), и в экзоскелете (этапы 11 и 12) в сагиттальной и фронтальной проекциях. Статистически значимые различия были обнаружены только для сагиттальной проекции (движения вперед-назад) – в экзоскелете показатель уменьшался на 20–50% в сравнении с этапами на табурете при управлении джойстиком правой и левой рукой соответственно. Аналогично оценен критерий энергоэффективности управления джойсти-



**Рис. 6.** “Box Plot” – медиана и кватили (отмечены прямоугольником с меткой), выбросы площади интегральной огибающей электромиограммы мышц ( $\mu\text{V sec}$ ) в группе добровольцев.

Вертикальными линиями отделены группы исследуемых мышц, цифрами на горизонтальной оси обозначены порядковые номера этапов с управлением джойстиком, сидя на табурете, правой и левой рукой соответственно – 4 и 5, и, сидя в экзоскелете, – 9 и 10 согласно описанной выше методике. **\*\***  $p < 0.01$  по критерию Уилкоксона.

ком. В экзоскелете значение показателя увеличивается на 10–35% ( $p < 0.001$ ) для правой и левой руки соответственно. Значимые различия по показателю внешнего результата  $\text{Tr}$  отсутствовали.

При сравнении показателей площади интегральной огибающей электромиограммы изучаемых групп мышц (для анализа применялся непараметрический критерий Уилкоксона) значимые различия были установлены только для мышц квадрицепсов бедра (MQF) – увеличение показателя в 4 раза в сравнении с сидением на табурете для левой и правой ноги. Показатели, сидя на табурете, в сравнении с вертикальной позой в первой фазе не отличались.

Установлена корреляция между усилением сокращения левого квадрицепса (MQF) и правой передней большеберцовой мышцей (МТА) при манипулировании джойстиком правой рукой (заметная сила связи по шкале Чеддока,  $p < 0.001$ ). Получена корреляция между показателем смещения ЦД и стороной манипулирования (умеренная сила связи по шкале Чеддока,  $p < 0.001$ ). При манипулировании левой рукой происходило смещение координаты ЦД на табурете вправо на 2 мм и на 5 мм в экзоскелете относительно центра платформы. При управлении правой рукой – влево на 9 мм, сидя на табурете, и на 6 мм в экзоскелете.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на отсутствие серьезных различий между обычным сидением на табурете и “гибридной позой” по внешнему результату целенаправленных надавливающих рукой на неподвижный джойстик, следует отметить выявленные особенности

моторного контроля, связываемые с “гибридной позой”. На наш взгляд, это вносит новые полезные элементы в изучение организации движений у человека.

Предложенная Бернштейном теория [19] описывала уровни построения движения, предполагая вовлеченность различных уровней центральной нервной системы в регуляцию. Так же, как и широко проникшие в биологию ранее идеи Анохина [20] эти концепции, полагаем, представляют собой биологические адаптации более формализованной теории автоматического управления. Хорошо известны биомеханические модели, связывающие контроль вертикальной позы с адаптивным изменением жесткости мышц, действующих подобно пружинам в системе типа “перевернутого маятника” [3]. Различные виды критики и уточнений к подобным моделям [18] оставляют здесь ключевую идею по отношению к регуляции позы — “экономия” ресурсов нервной системы за счет периферических регулирующих компонентов (самих мышц), действующих автономно. Вместе с тем, давно обсуждаются наблюдения на вертикально стоящих людях, касающиеся рефлекторных взаимосвязей в активности различных мышц, а также спинальных и транскортикальных путей регуляции (например, [21]). По сути, это направление, имея концептуально разные подходы (из “чистой” биомеханики и из нейрофизиологии), связано с изучением упреждающих движений, антиципаторной активности нервной системы и мышц, и, в итоге, двигающееся к теориям типа “внутренней модели тела”, а также к изучению системных влияний опорной афферентации и мультисенсорного обеспечения позы и движений (например, [22, 23]). Наличие дополнительных технических средств может приводить к изменению функциональных состояний человека за счет развития адаптаций к новым условиям. Влияния экзоскелета, очевидно, имеют физиологические эффекты, что, таким образом, подразумевает возможность объективной оценки состояний человека.

Основываясь на высказанном нами предположении, что разделение на подгруппы “визуалы” и “проприоцептики” может продемонстрировать разную эффективность применения устройства, было показано изменение постурального контроля в подгруппах. В связи с более выраженным вовлечением проприоцептивной афферентации на поддержание равновесия, группе “проприоцептики” могло потребоваться больше времени для освоения и тренировки контроля позы при использовании экзоскелетов. Подобное разделение испытуемых по простому тесту на силовой платформе с открыванием и закрыванием глаз может представлять практический интерес для прогноза успешности освоения внешних устройств.

Опираясь на теорию функциональных систем Анохина, мы полагаем, что внешний результат целенаправленного двигательного акта может мало зависеть от особенностей моторного контроля, в том числе, распределения активности мышц конечностей, включенных в систему его выполнения, но при этом может отличаться внутренней архитектурой — в случае искусственного ограничения подвижности конечностей. На наш взгляд, в какой-то степени предысторией реализованной процедуры наблюдения можно считать эксперименты с силовой платформой и рукоятью, с которой доброволец взаимодействовал в разных режимах (например, [21, 24]). В “гибридной позе” мы наблюдали различные модулирующие влияния стабильности позы и ее конфигурации на особенности выполнения задачи управления. Впервые показаны особенности “гибридной позы”, проявлявшиеся в перераспределении активности исследуемых мышц относительно раскачивания в обычной вертикальной позе. При этом солидная общая устойчивость тела, обусловленная специальным типом экзоскелета, по-видимому, “оценивалась” мозгом как “достаточная” для того, чтобы не использовать контакт с рукоятью силового джойстика как средство дополнительного контроля позы — то есть, контроль стабильности “гибридной позы”, вероятно, обеспечивался только активностью постуральных мышц и “включением” в схему управления позой экзоскелета, связанной, в том числе, с ограничением степени свободы коленных суставов, доступными условиями

регуляции. Впервые выявлены особенности моторного контроля при целенаправленных нажатиях рукой в положении сидения на табурете и в “гибридной позе” по сравнению с управлением из положения, сидя на табурете, которое характеризовалось повышением сложности манипулирования при одинаковой результативности.

Возвращаясь к объяснению Анохиным работ с его аспиранткой Чепелюгиной, выделим интегрирующую роль функционального образования (“функциональной системы”), состав которого не ограничивается только центральными структурами, но включает и периферические элементы, которые не определяются “топографической близостью структур или их принадлежностью к какой-либо существующей анатомической классификации”, центральная интеграция оказывается бесполезной при соответствующем дефиците афферентации, и что “единственным фактором, определяющим избирательность этих соединений, является биологическая и физиологическая архитектура самой функции, а в отдельных случаях даже ее механика” [1]. Мы полагаем, что в данных представлениях пассивный экзоскелет нижних конечностей, обеспечивая “гибридную позу”, вызывает действие такой функциональной системы, в которой существует дефицит афферентации от временно “выключенных” коленных областей и, наоборот, есть новая афферентация от плотно прилегающих к телу частей экзоскелета, связанных с увеличенной площадью опоры (рис. 2). При этом механика устройства задает тон адаптивной регуляции позы, вызывая непривычные взаимосвязи мышц конечностей и туловища. С прикладной точки зрения – например, реабилитационного применения экзоскелетов, можно отметить, что понимание таких закономерностей будет способствовать разработке более эффективных устройств и способов их применения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем наблюдении получены следующие выводы, которые можно представить по пунктам, в порядке описанных выше результатов:

1. Распределение добровольцев по вкладу зрения в контроль заданной позы (стабилометрия): условные “проприоцептики” и “визуалы” сохраняют присущие им особенности сенсорного обеспечения вертикальной позы при облачении в специальную экипировку (экзоскелет).

2. Распределение добровольцев по вкладу зрения в контроль заданной позы (электромиография): по асимметрии напряжения мышц контрлатеральных опорных конечностей (квадрицепсы бедра и передние большеберцовые мышцах) добровольцы практически не отличались от установленного по данным стабилометрии их “сенсорного профиля”, демонстрируя значимые отличия “визуалов” и “проприоцептиков” только в части стратегии управления мышцами при закрывании глаз в надетой экипировке (экзоскелете).

3. Контроль позы при ритмическом фронтальном раскачивании (стабилометрия): если без экзоскелета оба исследуемых типа сенсорной организации показывали сходные возможности, то в “гибридной позе” возможность более широкого раскачивания демонстрировали “проприоцептики”.

4. Контроль позы при ритмическом фронтальном раскачивании (электромиография): с точки зрения необходимых мышечных усилий в группе добровольцев практически не было отличий, связанных с наиболее воспринимаемым ими типом сенсорной сигнализации, что может в данном случае указывать на ведущую роль сенсорного обеспечения по сравнению с силой мышц.

5. Контроль позы при ритмическом сагиттальном раскачивании (стабилометрия): особенности организации “гибридной позы” в данном случае никак не влияли на обычные возможности раскачивания вертикальной позы добровольцев, что можно объяснить свойствами конструкции.

6. Контроль позы при ритмическом сагиттальном раскачивании (электромиография): установлены особенности “гибридной позы”, проявлявшиеся в перераспределении активности исследуемых мышц относительно раскачивания в обычной вертикальной позе.

7. Внешние результаты — целенаправленные нажатия рукой: по сравнению с управлением из положения, сидя на табурете, управление в “гибридной позе” отличалось в повышении сложности манипулирования при одинаковой результативности.

8. Параметры моторного контроля при целенаправленных нажатиях рукой в положении сидения на табурете и в “гибридной позе”: в группе добровольцев наблюдалась меньшая стабильность позиционирования тела в данном экзоскелете, чем на табурете; при этом напряжение исследуемых мышц при “стоячем сидении” выше, чем при обычном сидении; выявлены данные, указывающие на системные перестройки для обеспечения управления путем изменения активности мышц ног относительно контрлатеральной и ипсилатеральной управляющей руки; наличие зрительно-моторной задачи и особенности “гибридной позы” здесь нивелировали влияния преимущественно “зрительного” или преимущественно “проприоцептивного” сенсорного обеспечения позиционирования тела.

Полагаем, что наше наблюдение может оказаться полезным для разработки новых методик исследования организации позы и движений у человека с применением устройств, меняющих привычную регуляцию позы, например, экзоскелетов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Н.Д.Б. — подготовка и проведение наблюдения, разработка методики, расчеты и анализ данных, подготовка текста и рисунков, оформление и подача рукописи. О.В.К. — разработка методики, интерпретация, участие в подготовке рукописи, общий контроль. И.В.М. — подготовка и проведение наблюдения, координация, участие в подготовке рукописи. И.А.О. — участие в подготовке методики и рукописи. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи и согласны с порядком представления авторов (по алфавиту).

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Наблюдение выполнялось в рамках работы ФГБНУ “НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина” и ИПМ им. М.В. Келдыша РАН. Исследование частично выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 18-31-20068, 18-08-01441.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем признательность всем добровольцам, принявшим участие в наблюдении. Благодарим заведующего лабораторией средств индивидуальной защиты НИИ медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова к. м. н. А.М. Гереева за техническую поддержку наблюдения согласно договору с НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина. Особая благодарность врачу-неврологу А.В. Деевой, которая на момент проведения наблюдения работала в лаборатории физиологии функциональных состояний человека НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина и оказала помощь в регистрации показателей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Анохин П.К.* (1968) Биология и нейрофизиология условного рефлекса. М. Медицина. [Anohin P.K. (1968) *Biology and neurophysiology of the conditioned reflex.* M. Medicina. (In Russ)].

2. *Bezodis NE, Willwacher S, Salo AIT* (2019) The Biomechanics of the Track and Field Sprint Start: A Narrative Review. *Sports Med* 49(9): 1345–1364. <https://doi.org/10.1007/s40279-019-01138-1>
3. *Winter DA, Paila AE, Prince F, Ishac M, Gielo-Perczak K* (1998) Stiffness control of balance in quiet standing. *J Neurophysiol* 80(3): 1211–1221. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.3.1211>
4. *Le Mouel C, Brette R* (2019) Anticipatory coadaptation of ankle stiffness and sensorimotor gain for standing balance. *PLoS Comput Biol* 22; 15(11): e1007463. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007463>
5. *Кручинин ПА* (2019) Анализ результатов стабилومترических тестов со ступенчатым воздействием с точки зрения механики управляемых систем. *Биофизика* 64(5): 1010–1020. [*Kruchinin PA* (2019) Analysis of the results of stablometric tests with a step effect from the point of view of the mechanics of controlled systems. *Biofizika* 64(5): 1010–1020. (In Russ)].
6. *Кожина ГВ, Левик ЮС, Попов АК, Сметанин БН* (2017) Влияние пассивного тактильного контакта руки на поддержание вертикальной позы человека. *Физиология человека* 43(4): 70–77. [*Kozhina GV, Levik Yu.S. Popov AK, Smetanin BN* (2017) Influence of passive tactile contact of the hand on maintaining the vertical posture of a person. *Human Physiol* 43(4): 70–77. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2020-60-5-318-328>
7. *Бабанов НД, Кубряк ОВ* (2020) Физиологические методики в изучении “пассивных” промышленных экзоскелетов спины и нижних конечностей. *Медицина труда и промышл экология* 5: 318–328 [*Babanov ND, Kubryak OV* (2020) Physiological methods in the study of “passive” industrial exoskeletons of the back and lower extremities. *Rus J Occupat Health and Industrial Ecology* 5: 318–328. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2020-60-5-318-328>
8. *Noguchi M, Glinka M, Mayberry GR, Noguchi K, Callaghan JP* (2019) Are hybrid sit-stand postures a good compromise between sitting and standing? *Ergonomics* 62(6): 811–822. <https://doi.org/10.1080/00140139.2019.1577496>
9. *von Glincki A, Yilmaz E, Mrotzek S, Marek E, Jettkant B, Brinkemper A, Fisahn C, Schildhauer TA, Gefßmann J* (2019) Effectiveness of an on-body lifting aid (HAL® for care support) to reduce lower back muscle activity during repetitive lifting tasks. *J Clin Neurosci* 63: 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.01.038>
10. *Письменная ЕВ, Петрушанская КА, Котов СВ, Аведиков ГЕ, Митрофанов ИЕ, Толстов КМ, Ефаров ВА* (2019) Клинико-биомеханическое обоснование применения экзоскелета “Экзоатлет” при ходьбе больных с последствиями ишемического инсульта. *Рос журн биомех* 23(2): 204–230. [*Pismennaya EV, Petrushanskaya KA, Kotov SV, Avedikov GE, Mitrofanov IE, Tolstov KM, Efarov VA* (2019) Clinical and biomechanical substantiation of the use of the exoskeleton “Exoathlet” when walking in patients with the consequences of ischemic stroke. *Rus J Biomech* 23(2): 204–230. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15593/RZhBiomeh/2019.2.04>
11. *Джелдубаева ЭР, Бирюкова ЕА, Махин СА, Бабанов НД, Чуян ЕН, Кубряк ОВ* (2020) Максимальная амплитуда электромиограмм сгибателей и разгибателей рук в серии сеансов управления силовым джойстиком у здоровых добровольцев. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 106(1): 44–54. [*Dzheldubaeva ER, Biryukova EA, Makhin SA, Babanov ND, Chuyan EN, Kubryak OV* (2020) Electromyogram Maximum Amplitudes in Arm Flexors and Extensors in Healthy Volunteers in a Series of the Power Joystick Control Training Sessions. *Neurosci Behav Physiol* 106(1): 44–54. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813920010069>
12. *Бабанов НД, Бирюкова ЕА, Джелдубаева ЭР, Махин СА, Чуян ЕН, Кубряк ОВ* (2020) Динамика параметров малоамплитудных движений рук при повторяющейся двигательнo-когнитивной задаче. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 106(11): 1370–1384. [*Babanov ND, Biryukova EA, Dzheldubaeva ER, Mahin SA, Chuyan EN, Kubryak OV* (2020) Dynamics of parameters of low-amplitude hand movements in a repetitive motor-cognitive task. 106(11): 1370–1384. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0869813920110035>
13. *Baker DH, Vilidaitė G, Lygo FA, Smith AK, Flack TR, Gouws AD, Andrew TG* (2020) Power contours: optimising sample size and precision in experimental psychology and human neuroscience. *Psychol Methods* Jul 16. <https://doi.org/10.1037/met0000337>
14. *Портнова ГВ, Сысоева ОВ, Иванецкий АМ* (2010) Психофизиологическое исследование влияния звуковой ритмической стимуляции на субъективный отсчет времени и скорость выполнения когнитивных заданий. *Журн высш нерв деятельн им ИП Павлова* 60(4): 419–429. [*Portnova GV, Sysoeva OV, Ivanickij AM* (2010) Psychophysiological study of the effect of sound rhythmic stimulation on the subjective timing and speed of performance of cognitive tasks. *J Higher Nerv Activity IP Pavlova*. 60(4): 419–429. (In Russ)].
15. *Николаев СГ* (2015) Атлас по электромиографии. Иваново. ПресСтo. [*Nikolaev SG* Electromyography Atlas. Ivanovo. PresSto. (In Russ)].
16. *Мощенко МГ, Егоров ГП, Бабанов НД, Кубряк ОВ* (2019) Пассивный экзоскелет нижних конечностей человека и облегченный протокол оценки физиологической эффективно-

- сти. Динамика сложных систем-XXI век 13(4): 23–28. [Moshchenko MG, Egorov GP, Babanov ND, Kubryak OV (2019) Passive exoskeleton of human lower extremities and a lightweight protocol for assessing physiological effectiveness. Dynamics of complex systems-XXI century 13(4): 23–28. (In Russ)].
17. Grokhovskii SS, Kubryak OV (2018) A method for integral assessment of the effectiveness of posture regulation in humans. Biomedical Engineering (Springer US) (English translation of Meditsinskaya Tekhnika) 52(2): 138–141. <https://doi.org/10.1007/s10527-018-9799-7>
  18. Savagna GA (1975) Force platforms as ergometers. J Appl Physiol 39(1): 174–179.
  19. Бернштейн НА (1947) О построении движений. М. Медицина [Bernshtejn NA (1947) About the construction of movements. M. Medicine. (In Russ)].
  20. Анохин ПК (1975) Очерки по физиологии функциональных систем. М. Медицина. [Anokhin PK (1975) Essays on the physiology of functional systems M. Medicina. (In Russ)].
  21. Woollacott MH, Bonnet M, Yabe K (1984) Preparatory process for anticipatory postural adjustments: modulation of leg muscles reflex pathways during preparation for arm movements in standing man. Exp Brain Res 55(2): 263–271. <https://doi.org/10.1007/BF00237277>
  22. Kasai T, Kawai K (1994) Quantitative EMG analysis of anticipatory postural adjustments of voluntary contraction of leg muscles in standing man. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 93(3): 184–187. [https://doi.org/10.1016/0168-5597\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0168-5597(94)90039-6)
  23. Левик ЮС (2020) Исследования в космосе и новые концепции в физиологии движений. Авиакосм и эколог мед 54(6):80-91. [Levik YS (2020) Research in space and new concepts in the physiology of movements. Aerospace and Environment Med 54(6): 80–91. (In Russ)]. <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2020-54-6-80-91>
  24. Cordo PJ, Nashner LM (1982) Properties of postural adjustments associated with rapid arm movements. J Neurophysiol 47(2): 287–302. <https://doi.org/10.1152/jn.1982.47.2.287>

### Features of Motor Control of Healthy Volunteers in a “Hybrid Pose” Due to the Lower Limb Exoskeleton

N. D. Babanov<sup>a, \*</sup>, O. V. Kubryak<sup>a</sup>, I. V. Merkurjev<sup>b</sup>, and I. A. Orlov<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia

<sup>b</sup>National Research University “Moscow Power Engineering Institute”, Moscow, Russia

<sup>c</sup>Keldysh Institute of Applied Mathematics (Russian Academy of Sciences), Moscow, Russia

\*e-mail: n.babanov@nphys.ru

In an observation on 24 healthy young male volunteers, the effect of the passive exoskeleton of the lower extremities on motor control was studied. In the exoskeleton, a posture was studied, which is an intermediate state between standing and sitting - a “hybrid posture”. *Methods.* We analyzed the data of surface electromyography from *Musculus quadriceps femoris* and *Musculus tibialis anterior* of both legs, data from the force platform, and parameters of instruction execution in a task with visual feedback on the support reaction during alternate manipulation with both hands. One of the conditions influencing the parameters of motor control in the “hybrid posture” is the predominant type of sensory organization in the usual vertical posture. *Results* Differences between the “hybrid posture” under the described conditions from a simple vertical posture were more clearly revealed during rhythmic purposeful swinging of the sample volunteers in the sagittal and frontal planes, as a redistribution of the activity of the muscles under study and differences in the swinging amplitude in the frontal plane for conventional “proprioceptors” and “visuals”. *Discussion.* The control of the upper limbs (pressure on the fixed handle due to the instruction) practically did not depend on the peculiarities of the sensory organization of the posture under the conditions of the given visual control. In the variants of the vertical posture with and without exoskeleton, there was a difference in the complexity of manipulation (more in the “hybrid posture”) with the same effectiveness.

*Keywords:* vertical posture, hybrid posture, posture sensory support, stabilometry, support reactions, electromyography, exoskeleton, motor-cognitive tasks, motor tests