СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Канал TRPC6 в подоцитах почечных гломерул
В. Б. Михайлова, А. В. Карпушев, Ю. С. Юдина 135

Физиология и психология – диалектика взаимодействия при решении психофизиологической проблемы
А. Д. Ноздрачев, Ю. В. Щербатых 154

Экспериментальные статьи

Изменения клеток Колмера у крыс линии SHR после ишемии головного мозга
О. В. Кирик, Д. Л. Цыба, О. С. Алексеева, М. Э. Колпакова, А. А. Яковлева, Д. Э. Коржевский 177

Влияние однократной нормобарической гипоксии у крыс в возрасте 10 дней на сенсомоторное развитие и поведение животных
Д. Д. Хухарева, Ю. А. Суханова, Е. А. Себенцова, Н. Г. Левицкая 187

Развитие осевой локомоторной мускулатуры у половозрелого окуня-клювача *Sebastes mentella* (Sebastidae)
В. П. Панов, С. С. Сафонова, А. М. Орлов, А. Ю. Рольский, Д. В. Артеменков 203

Age-related changes of voluntary attention process
A. A. Tumanian, N. E. Tadevosyan, A. S. Khachunts, I. G. Tadevosyan, E. G. Kostanyan, and Z. H. Haji Beygi 221

Экспрессия генов глутаматных рецепторов в гиппокампе и лобной коре у крыс линии ГК с генетической каттонией
В. С. Плеканчук, М. А. Рязанова 232

Сравнительная характеристика аминокислотного состава и активности ферментов аминокислотного обмена в гемохориальной плаценте разных видов животных и человека
Т. Н. Погорелова, В. О. Гунько, А. А. Никашина, И. А. Аллилуев 243

Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова
Правила для авторов (2021 г.) 258

CONTENTS

Reviews

TRPC6 Channel in Podocytes of the Renal Glomeruli
V. B. Mikhailova, A. V. Karpushev, and Yu. S. Yudina 135

Physiology and Psychology – Dialectics of Interaction in Solving a Psychophysiological Problem
A. D. Nozdrachev, and Yu. V. Scherbatykh 154

Experimental Articles

Alterations in Kolmer Cells in SHR Line Rats after Brain Ischemia
O. V. Kirik, D. L. Tsyba, O. S. Alekseeva, M. E. Kolpakova, A. A. Jakovleva, and D. E. Korzhevskii 177

Impact of Acute Normobaric Hypoxia in 10-Day-Old Rats on Sensorimotor Development and Behaviour of Animals
D. D. Khukhareva, Yu. A. Sukhanova, E. A. Sebentsova, and N. G. Levitskaya 187

Development of Axial Locomotor Musculation of Beaked Redfish *Sebastes mentella* (Sebastidae)
V. P. Panov, S. S. Safonova, A. M. Orlov, A. Yu. Rolskii, and D. V. Artemenkov 203

Age-Related Changes of Voluntary Attention Process
A. A. Tumanian, N. E. Tadevosyan, A. S. Khachunts, I. G. Tadevosyan, E. G. Kostanyan, and Z. H. Haji Beygi 221

Expression of Glutamate Receptor Genes in the Hippocampus and Frontal Cortex in GC Strain Rats with Genetic Catatonia
V. S. Plekanchuk, and M. A. Ryazanova 232

Comparative Characteristic Amino Acid Composition and Activity of Enzymes of Amino Acid Metabolism in Hemochorial the Placenta of Different Animal Species and Humans
T. N. Pogorelova, V. O. Gunko, A. A. Nikashina, and I. A. Alliluev 243

Rules for Authors. 2021 258

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 2, с. 135–153

ОБЗОРЫ

КАНАЛ TRPC6 В ПОДОЦИТАХ ПОЧЕЧНЫХ ГЛОМЕРУЛ

© 2021 г. В. Б. Михайлова[1], *, А. В. Карпушев[1], Ю. С. Юдина[1]

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

*****E-mail: hastar.teerend@yandex.ru*

Поступила в редакцию 18.10.2020 г.
После доработки 02.12.2020 г.
Принята к публикации 10.12.2020 г.

Важнейшим компонентом фильтрационного аппарата почечных гломерул являются специализированные клетки висцерального эпителия – подоциты. Физиологическая функция подоцитов критически зависит от надлежащей регуляции внутриклеточного содержания Ca^{2+}; избыточный вход Ca^{2+} в клетки может привести к нарушению морфологии клеток, подоцитопатии, апоптозу и последующему повреждению гломерулы в целом. Подоцитопатия является одной из основных характеристик протеинурии и фокально-сегментарного гломерулосклероза. Одним из ключевых белков, ответственных за вход Ca^{2+} в подоцитах, является ионный канал TRPC6. С момента первого обнаружения мутации в гене, кодирующем TRPC6, внимание научного сообщества сосредоточено на исследовании роли этого ионного канала в возникновении и развитии заболеваний почек. Как усиление, так и снижение функциональной активности TRPC6 сопряжено с проявлением тяжелых нефротических синдромов, ведущих к терминальной стадии хронической болезни почек. В обзоре приведены материалы, касающиеся регуляции активности TRPC6 и роли этого канала в патогенезе гломерулярных заболеваний.

Ключевые слова: почка, гломерула, подоцит, фокально-сегментарный гломерулосклероз, каналы TRPC, Ca^{2+} -сигнализация

DOI: 10.31857/S0869813921020035

Хроническая болезнь почек (ХБП), представляющая собой прогрессирующее снижение функции органов, происходящее на протяжении длительного периода времени, заключается в нарушении фильтрации плазмы крови, регуляции водно-

Список сокращений: ADP – аденозиндифосфат; Ang II – ангиотензин II; ASIC – семейство кислоточувствительных ионных каналов; AT_1 – рецептор ангиотензина II 1-го типа; ATP – аденозинтрифосфат; DAG – диацилглицерол; CaM – кальмодулин; CaMK – Ca^{2+}/CaM-зависимая протеинкиназа; CN – кальцинейрин; ENaC – эпителиальный натриевый канал; ERK – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; GDP – гуанозиндифосфат; GDP-βS – гуанозин-5'-O-2-тиодифосфат; GPCR – семейство рецепторов, сопряженных с G-белками; 20-HETE – 20-гидрокси-эйкозатетраеновая кислота; IP3 – инозитолтрифосфат; IP3R – рецептор инозитол-3-фосфата; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; NFAT – семейство транскрипционных ядерных факторов активированных Т-клеток; NOX2 – NADPH-оксидаза 2; OAG – 1-олеоил-2-ацетил-sn-глицерол; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; P2Y – семейство пуринергических рецепторов; PKC – протеинкиназа С; PLA – фосфолипаза А; PLA – фосфолипаза А; PLC – фосфолипаза С; PHB – прохибитин; STOML – семейство стоматин-подобных белков; TRPA – семейство анкириновых каналов транзиторного рецепторного потенциала; TRPC – семейство канонических каналов транзиторного рецепторного потенциала; UDP – уридиндифосфат; UTP – уридинтрифосфат; АФК – активные формы кислорода; ФСГС – фокально-сегментарный гломерулосклероз; ХБП – хроническая болезнь почек.

электролитного баланса, а также продукции эритропоэтина. Терминальная стадия ХБП имеет летальный исход, и для ее преодоления требуется применение диализа или пересадка почки. Тем не менее, даже небольшое снижение почечной функции влечет за собой значительное увеличение риска развития патологии и наступления смерти, часто от сердечно-сосудистых нарушений [1, 2].

Большинство случаев ХБП является неизбежным и естественным следствием системных патологий, таких как сахарный диабет, системная красная волчанка, гипертония или СПИД, которые приводят к почечной недостаточности и обычно сопровождаются дисфункцией различных систем органов. Однако некоторые формы ХБП, например первичный фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС), поликистоз почек, некоторые формы гломерулонефрита и некоторые обструктивные состояния, препятствующие нормальному оттоку мочи, возникают вследствие патологических процессов, которые первоначально проявляются в самой почке. Причинами таких патофизиологических состояний могут быть аутоиммунные реакции, либо причины следует искать в структурно-функциональных нарушениях, развивающихся в гломерулах, канальцах нефронов, почечном интерстиции или сосудистой сети. Отличительными чертами большинства форм ХБП выступают воспаление и фиброз почек. В свою очередь, снижение функции почек достаточно для того, чтобы вызвать системные нарушения, включая гипертонию, атеросклероз, дислипидемию, анемию, метаболический ацидоз, мышечную атрофию и остеопатию [3].

Известно, что дисфункция гломерулярных подоцитов и последующая их гибель лежат в основе возникновения и развития почечных заболеваний, таких как ФСГС, мембранозная нефропатия, диабетическая нефропатия и волчаночный нефрит [4–6]. Характерные деструктивные изменения в подоцитах заключаются в реорганизации актинового цитоскелета в отростках тела клетки, педикулах или ножках (foot process), что приводит к сглаживанию ножек и гипертрофии подоцитов. Результатом в конечном итоге является отслоение подоцитов от базальной мембраны и их появление в моче как целых клеток (подоцитурия), так и структурных белков (нефрина, подоцина), уменьшение количества подоцитов в гломерулах (подоцитопения) [7, 8]. Изменения числа или структуры подоцитов ведут к деструктуризации важнейшего компонента гломерулярного фильтрационного барьера – щелевой диафрагмы и развитию протеинурии [9]. Одним из молекулярных механизмов, определяющих функцию подоцитов или ее нарушение является Ca^{2+}-зависимая внутриклеточная сигнализация [10]. Ca^{2+}-проницаемые неселективные катионные каналы семейства TRPC (Transient Receptor Potential Canonical), экспрессирующиеся в различных органах, включая сердце, мозг и почку, являются воротами для входа наружного Ca^{2+} в клетку. Последние полтора десятка лет большое внимание научного сообщества привлечено к роли канала TRPC6 в регуляции почечной функции [11]. Обнаруженные мутации в гене этого канала приводят к развитию наследуемого ФСГС [12–14].

TRPC-каналы принадлежат к суперсемейству катионных каналов TRP, первый одноименный представитель которого был обнаружен у *Drosophila melanogaster* [11, 15]. У позвоночных подсемейство TRPC включает семь членов, которые могут быть распределены по четырем подгруппам: TRPC1, TRPC2, TRPC4/5 и TRPC3/6/7. В функциональном отношении каналы TRPC являются Ca^{2+}-проницаемыми неселективными катионными каналами, представляют собой тетрамеры, причем разные члены этой группы могут образовывать гетеротетрамеры, хотя точная стехиометрия эндогенно экспрессирующихся каналов TRPC еще недостаточно изучена. Известно, что TRPC6 может коиммунопреципитироваться с TRPC3, но не с TRPC5 в лизатах тканей коркового слоя почки.

В обзоре представлены материалы по регуляции функциональной активности TRPC6 и роли этого канала в патогенезе гломерулярных заболеваний.

КАНАЛЫ TRPC В ПОДОЦИТАХ

Подоциты представляют собой дифференцированные клетки висцерального эпителия, прикрепленные к поверхности базальной мембраны почечных гломерул, где, взаимодействуя друг с другом, образуют наиболее селективный компонент гломерулярного фильтрационного аппарата [16]. Одной из наиболее важных ультраструктурных особенностей подоцитов является наличие щелевой диафрагмы, специализированного соединения между смежными ножками. Щелевая диафрагма образует фильтр тонкой очистки, который позволяет просеивать молекулы в зависимости от их размера и формы [17, 18]. Диафрагма состоит из молекул, обычно экспрессирующихся в областях адгезивных контактов, таких как P-кадгерин, ZO-1 и FAT [19–21], а также тех, которые специфично экспрессируются в подоцитах, включая нефрин [17, 22], нефрин-подобный белок NEPH1 [23, 24] и подоцин [25]. Примечательно, что трансмембранный белок нефрин, являясь одним из компонентов внеклеточного матрикса, одновременно выступает в качестве внутриклеточной сигнальной молекулы, используя для передачи сигналов фосфорилирование тирозиновых остатков в цитоплазматических доменах [19]. Реакция подоцитов на повреждения и стресс в результате воздействия токсинов или повышения внутрикапиллярного давления заключается в сглаживании ножек и потере щелевой диафрагмы [26]. Если действие стрессорных факторов происходит в течение длительного периода времени, то количество подоцитов в пораженных гломерулах в конечном итоге уменьшается, и потеря около 25% подоцитов обычно приводит к гломерулосклерозу и утрате функции всего нефрона [27]. Таким образом, развитие ФСГС происходит в результате дисфункции подоцитов, гибели и отслоения клеток или изменений в ультраструктуре ножек подоцитов и межподоцитарной щелевой диафрагмы [28–30].

Известно, что TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5 и TRPC6 экспрессируются в подоцитах [31–34]. Электрофизиологическими и фармакологическими методами было показано, что TPRC3, TRPC5 и TRPC6 ответственны за вход Ca^{2+} в подоциты [33]. Каналы TRPC6 обнаруживаются в ножках подоцитов в области щелевой диафрагмы [13, 35–38]. Также TRPC6 наблюдаются в главных ножках (major process) и в теле клеток [39]. В разных клеточных компартментах TRPC6 выполняют различные функции и, по-видимому, находятся в различных макромолекулярных комплексах. Например, белок подоцин взаимодействует с TRPC6, расположенным на мембране ножек, но не тела клетки [40]. Коиммунопреципитация TRPC6 с TRPC3 из лизата клеточных линий подоцитов свидетельствует о том, что, по крайней мере, некоторые эндогенно экспрессирующиеся функциональные каналы являются гетеромерными TRPC6/TRPC3, как это обнаружено и в большинстве других тканей. Показано, что такие гетеромеры обладают повышенной механочувствительностью по сравнению с гомомерами любого типа [41].

МУТАЦИИ В TRPC6, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ФСГС

Среди каналов семейства TRPC наибольшее внимание исследователей привлекает к себе TRPC6. Критическое значение этого ионного канала для нормальной функции подоцитов подчеркивается рядом работ, сообщающих об идентификации мутаций в гене этого канала, связанных с нефротическими синдромами, в частности с ФСГС (табл. 1). В 2005 г. была впервые идентифицирована мутация в гене канала TRPC6, ассоциированная с ФСГС-аутосомно-доминантного типа наследова-

Таблица 1. Мутации в TRPC6, ассоциированные с ФСГС
Table 1. Mutations in TRPC6 associated with FSGS

Мутация Mutation	Функциональный тип мутации по электрофизиологическим данным Functional type of mutation according to electrophysiological data	Ссылка Reference
P112Q	Gain-of-function	[14]
R895C, E897K	Gain-of-function	[13]
N143S, S270T, K874X	Нет отличий от дикого типа No difference from wild-type	[13]
M132T	Gain-of-function	[12, 52]
N125S, L395A, G757D, L780P, R895L	Loss-of-function	[47]
P15S, A404V	Нет данных No data	[53, 54]
N110H	Gain-of-function	[55]
G109S, N125S, L780P	Нет данных No data	[56]
R175Q	Gain-of-function	[46]
R360H	Нет отличий от дикого типа No difference from wild-type	[47, 57]
H218L, R895L	Gain-of-function	[45]
C121S, D130V, G162R, I111I	Нет данных No data	[58]
Q889K	Gain-of-function	[44]

ния [14]. Развитие заболевания у пациентов с обнаруженной мутацией происходило во взрослом возрасте. Терминальная стадия наступала через 4–20 лет после первоначального проявления заболевания, и болезнь не рецидивировала после трансплантации [42]. Биофизические характеристики этой мутации (P112Q) были изучены в гетерологической экспрессионной системе (клетках линии HEK-293), и в результате было показано, что P112Q является усиливающей функцию канала мутацией (gain-of-function). Биохимические данные свидетельствовали о том, что P112Q вызывает увеличение количества TRPC6 на мембране, что указывает на изменения в транспортировке канала к плазматической мембране или интернализации. Позднее были выявлены еще несколько мутаций в TRPC6 у пациентов с ФСГС-аутосомно-доминантного типа наследования, большинство из которых также оказались gain-of-function [12, 13, 43–46]. Анализ клинических характеристик пациентов с этими мутациями формирует представление о роли TRPC6 в гломерулярных заболеваниях и свидетельствует о том, что хроническая гиперактивация TRPC6 и усиленный вход Ca^{2+} являются причиной развития почечных патологий. Ряд мутаций был обнаружен у пациентов с ранним, в детском возрасте, развитием ФСГС [12, 45]. Кроме того, были идентифицированы мутации, также ассоциированные с ФСГС, но приводящие к снижению функции канала (loss-of-function) [47].

Что известно на сегодняшний день о молекулярных механизмах, связывающих мутации в TRPC6 и клинические проявления нефротических синдромов? В одной из работ было показано, что следствием экзогенной экспрессии gain-of-function мутации (R895C) в культивируемых подоцитах является активация киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK1/2 – Extracellular-Regulated Kinase) [48]. В другой работе было продемонстрировано, что мутации P112Q, R895C и E897K ведут к

конститутивной активации транскрипционных факторов NFAT [49]. Причем, эти эффекты блокировались ингибиторами кальцинейрина (CN), Ca^{2+}/CaM-зависимой протеинкиназы (CaMK) и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). В свою очередь, в трансгенных мышах подоцит-специфическая экспрессия активной формы NFATc1 вызывала развитие протеинурии и гломерулосклероза [50]. Мутации в TRPC6 могут реализоваться в нарушении взаимодействия с белками-партнерами, что особенно важно в поддержании надлежащей морфологии ножек подоцитов. Известно, что TRPC6 взаимодействует со структурными белками щелевой диафрагмы, подоцином и нефрином [13, 35]. Взаимодействие с подоцином происходит между цитозольными С-концевыми доменами обоих белков и является функционально значимым для воротного механизма TRPC6 [36]. Взаимодействие между TRPC6 и нефрином регулирует доставку канала на клеточную поверхность подоцита [37, 51]. Нарушение взаимодействия между каналом TRPC6 и нефрином показано для мутации Y284F [51].

Несмотря на то, что TRPC6 стал объектом исследований в первую очередь в связи с наследственными нефротическими синдромами, следует отметить, что наследственные формы ФСГС довольно редки по сравнению с ненаследственными или приобретенными. Актуальным является вопрос о причинах и механизмах нарушения регуляции TRPC6 дикого типа у пациентов с ненаследственными формами гломерулярных заболеваний.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАНАЛА TRPC6 В ПОДОЦИТАХ

Наиболее изученным, каноническим, путем регуляции активности канала TRPC6 в подоцитах является сигнальный каскад, запускаемый стимуляцией рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR – G Protein-Coupled Receptor) (рис. 1). Примером может послужить активация TRPC6 ангиотензином II (Ang II) [59]. Ang II, действуя через ангиотензиновые рецепторы AT_1, играет критическую роль в развитии протеинурии и в прогрессировании почечных повреждений при ФСГС [60]. Стимуляция AT_1-рецепторов вызывает вход Ca^{2+} из внеклеточной среды [61]. Было показано, что увеличение экспрессии AT_1 в подоцитах трансгенных крыс приводит к развитию протеинурии и ФСГС [62].

С помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации whole-cell в подоцитах изолированных и декапсулированных гломерул крысы или в подоцитах иммортализованной клеточной линии было продемонстрировано, что Ang II в наномолярных концентрациях индуцирует катионный ток выходящего выпрямления. Отсутствие тока в подоцитах с нокдауном TRPC6 свидетельствовало об участия канала TRPC6 в генерации Ang II-вызванного катионного тока [59]. Кроме того, эффект Ang II полностью блокировался микромолярными концентрациями La^{3+} [59], что также подтверждает роль TRPC6, т.к. активность канала TRPC5, экспрессируемого в подоцитах, усиливается La^{3+} [34].

Сходный с Ang II эффектом на катионный ток канала TRPC6 обладает другой агонист GPCR, ATP. Действующий через P2Y-рецепторы ATP также индуцировал в подоцитах катионный ток выходящего выпрямления [63]. Эффект ATP блокировался сурамином, относительно неселективным ингибитором P2Y-рецепторов. Ответы на другие агонисты P2Y-рецепторов, ADP, UTP или UDP, показывают, что в активации канала TRPC6 играют роль различные подтипы рецепторов, $P2Y_1$, $P2Y_2$ и $P2Y_6$ [63]. Отметим, что ответы как на ATP так и Ang II в подоцитах устранялись введением в цитоплазму клетки гуанозин-5'-О-2-тиодифосфата (GDP-βS), аналога GDP, устойчивого к гидролизу и фосфорилированию, это указывает на то, что Ang II- и ATP-вызванная активация TRPC6 опосредуется G-белками [59, 63].

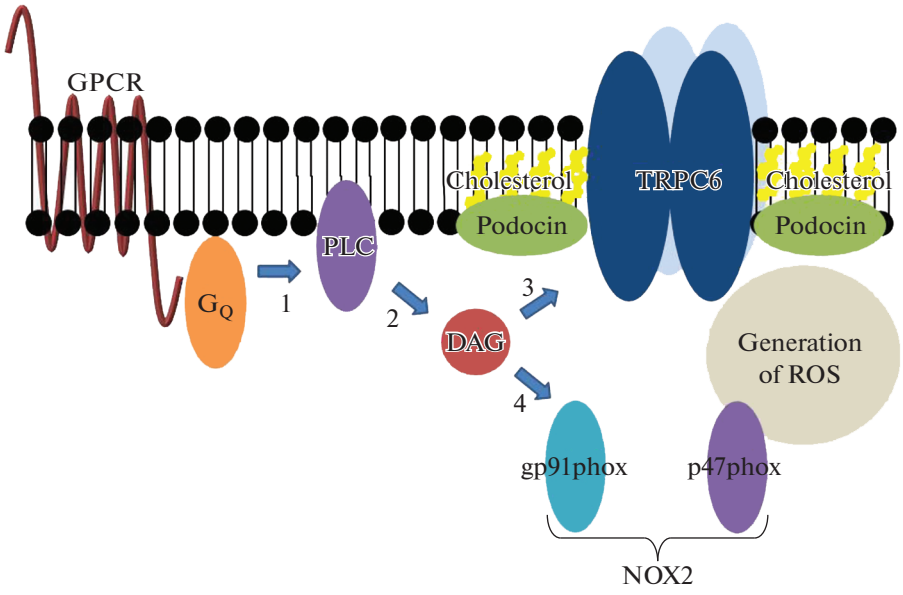

Рис. 1. Схема GPCR-зависимой активации TRPC6.
Стимуляция GPCR активирует сигнальный путь, включающий последовательно активацию G-белка G_Q, PLC (1), продукцию DAG (2), активацию TRPC6 (3). DAG активирует NADPH-оксидазу NOX2 (4) с образованием комплекса, содержащего каталитическую, gp91phox, и регуляторную, p47phox, субъединицы. Продукция АФК NADPH-оксидазой сопряжена с увеличением количества TRPC6 на клеточной мембране. Подоцин фиксирует каналы TRPC6 в холестерол-обогащенных мембранных доменах.
Источник: [39] с модификацией.
Fig. 1. Scheme of GPCR-dependent activation of TRPC6.
Stimulation of GPCR activates a signaling pathway that includes G-protein G_Q, PLC activation (1), production of DAG (2), which acts on the TRPC6 channel (3). DAG activates NOX2 NADPH oxidase (4) with the formation of a complex containing the catalytic, gp91phox, and regulatory, p47phox, subunits. Generation of ROS by NADPH oxidase is associated with an increase in the TRPC6 surface expression. Podocin tethers TRPC6 in cholesterol-rich membrane domains.
Source: [39] with modification.

В обоих случаях эффекты лигандов подавлялись блокированием фосфолипаза С (PLC)-зависимого сигнального пути агентом D609 [59, 63].

В гетерологической экспрессионной системе, клетках линии CHO-K1, был исследован сигнальный каскад активации TRPC6. Было продемонстрировано участие гетеротримерных G-белков, PLC и диацилглицерола (DAG) в передаче сигнала на канал TRPC6 при стимуляции GPCR (рис. 1). Причем было показано, что конечным эффектором является именно DAG, поскольку активация TRPC6 имеет протеинкиназа С (PKC)-независимый характер [64]. Однако более позднее исследование показало, что ингибирование PKC или ее активация соответственно усиливают или подавляют индуцированный агонистом вход Ca^{2+} в клетках, экспрессирующих экзогенный TRPC6 [65]. Заметим, что инозитолтрифосфат (IP3), образуемый фосфолипазой вместе с DAG, не имел эффектов на TRPC6-опосредуемый ток [64].

С рассмотренным фармакологическим анализом ответов на Ang II и ATP согласуются данные по активации TRPC6-опосредованных катионных токов в подоцитах мембранно-проницаемым аналогом DAG, 1-олеоил-2-ацетил-sn-глицеролом (OAG) [38, 66]. Вполне вероятно, что активация GPCR дает начало двум отдель-

ным процессам: мобилизации ионных каналов на клеточной поверхности, т.е. встраиванию новых каналов TRPC6, и увеличению вероятности открытия каналов. Было показано, что стимуляция GPCR увеличивает количество TRPC6 на мембране, что может происходить всего через 5 с после начала действия агониста GPCR и при концентрациях агониста ниже, чем требуется для активации TRPC6 [67]. В соответствии с этим механизмом индукции TRPC6-опосредованного тока утверждается, что OAG стимулирует увеличение экспрессии TRPC6 на поверхности подоцитов [66]. Очень похожие эффекты усиления активности TRPC6 наблюдаются в подоцитах и в гетерологической экспрессионной системе при обработке клеток метаболитом арахидоновой кислоты – 20-гидрокси-эйкозатетраеновой кислотой (20-HETE – 20-HydroxyEicosaTetraEnoic acid), которая может высвобождаться из прегломерулярных микрососудов и воздействовать на другие типы клеток гломерул через паракринные сигнальные механизмы [68, 69].

В настоящее время большое количество экспериментальных данных указывает на сигнальную роль активных форм кислорода (АФК) в модуляции каналов TRPC6 в подоцитах (рис. 1). Обработка подоцитов H_2O_2 значительно увеличивает количество каналов TRPC6 на мембране и усиливает катионные токи [70]. Следует заметить, что Ang II- и ATP-вызванная активация TRPC6 в подоцитах блокируется гасителями АФК или ингибиторами продукции АФК, т.е. ингибиторами NADPH-оксидазы NOX2 [59, 63]. Кроме того, показано, что ATP и Ang II, так же как и 20-HETE, увеличивают выработку АФК в подоцитах [68]. Также наблюдается увеличение продукции АФК под действием OAG, а эффект последнего на TRPC6 также блокируется ингибиторами NOX2 [38]. Реципрокная коиммунопреципитация каталитической субъединицы NOX2 gp91phox и канала TRPC6 свидетельствует об образовании комплекса NOX2–TRPC6 в культивируемых подоцитах. Причем, образованию таких комплексов препятствует нокдаун гена структурного белка щелевой диафрагмы подоцина, что позволяет предположить, что последний играет роль соединительного мостика между NOX2 и TRPC6 (рис. 1) [38]. Вполне вероятно, что такие комплексы образуются в богатых стеролами мембранных доменах, организованных подоцином, образующим олигомеры более высокого порядка [25, 71]. Взаимодействие с подоцином также может связывать TRPC6 с цитоскелетом через CD2-ассоциированный белок (CD2AP) [25]. Комплекс NOX2–TRPC6 может служить для создания относительно высоких концентраций АФК в непосредственной близости от ионного канала без значительных изменений в концентрации АФК в глубине цитоплазмы. Известно, что DAG стимулирует активность NADPH-оксидазы, способствуя сборке активных мультимерных комплексов NOX2, содержащих каталитическую, gp91phox, и регуляторную, p47phox, субъединицы [72–75], что в свою очередь приводит к увеличению количества TRPC6 на мембране [38]. Важно отметить, что эффект увеличения количества TRPC6 блокируется агентами, элиминирующими АФК, ингибирующими NOX2, включая ингибитор малого G-белка Rac1, и дезорганизацией липидных рафтов с помощью нокдауна гена подоцина [38]. Редокс-регуляция, по-видимому, характерна для многих членов суперсемейства TRP [76]. Молекулярные и биофизические механизмы, посредством которых АФК увеличивают количество TRPC6 на мембране, на сегодняшний день не известны. Однако в ряде работ показано, что канал TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin) демонстрирует сходную чувствительность к АФК [77], которые, по-видимому, активируют TRPA1 за счет окисления остатков цистеина внутри анкирин-подобных повторов в цитозольном N-конце [78, 79]. TRPC6 имеет сходные анкирин-подобные повторы в своем N-конце, хотя их количество значительно меньше, чем у TRPA1 [80]. Высказываются также предположения о возможном участии активных форм азота в регуляции активности TRPC6, напри-

мер, в NO-зависимом S-нитрозилировании TRPC6, как способе стабилизации ионного канала в открытом состоянии [70].

В подоцитах существует еще один путь активации каналов TRPC6. Это активация механическими стимулами, которая, по-видимому, принципиально отличается от процессов, происходящих во время передачи сигналов от GPCR [36, 81, 82]. Катионный ток в подоцитах возникает в ответ на растяжение клеточной мембраны [36]. Растяжение мембраны, вызванное кратковременным помещением клеток в гипоосмотический внешний раствор, который вызывает набухание клеток, используется как наиболее простой для воспроизводимости результатов экспериментальный механический стимул, хотя не является физиологически адекватным для подоцитов. Очевидно, что набухание клеток в гипоосмотической среде приводит к быстрым структурным перестройкам цитоскелета, которые, в свою очередь, изменяют внутреннее натяжение мембраны. Нет сомнений, что катионные токи, вызванные растяжением мембраны в подоцитах, опосредуются каналами TRPC6, поскольку они устраняются нокдауном TRPC6 и селективным ингибитором TRPC6 SAR-7334 [36, 81]. Также эти токи блокируются микромолярными концентрациями La^{3+}, токсином паука GsMTx4, который подавляет механически вызванную активацию широкого диапазона каналов, в том числе, TRPC1 и TRPC6 [36]. Сигнальные пути механической активации TRPC6 в подоцитах, по-видимому, отличаются от таковых при GPCR-зависимой активации. Механическая активация TRPC6 сохраняется в присутствии гасителей АФК, а также при введении в клетки GDP-βS, при обработке ингибиторами PLC или фосфолипазы A (PLA) [36]. Напротив, активация каналов TRPC6 с помощью OAG или 20-HETE блокируется гасителями АФК [38, 68]. Следовательно, причиной механической активации TRPC6 в подоцитах не может быть вызванная растяжением активация GPCR, фосфолипаз или NADPH-оксидаз, хотя есть доказательства того, что это может происходить в клетках других типов [83]. Кроме того, показано существование, по крайней мере, одной мутации в TRPC6 (N143S), ассоциированной с ФСГС, которая устраняет механическую активацию ионного канала, в то же время позволяя активировать его с помощью OAG или воздействия на GPCR [84]. Некоторыми исследователями выдвигается гипотеза, что каналы TRPC6 являются непосредственно механочувствительными [70, 85]. Гипотеза подтверждается регистрацией токов TRPC6-каналов в изолированных фрагментах мембран (конфигурация inside-out) трансфицированных CHO клеток в ответ на отрицательное давление [85]. Однако механочувствительность TRPC6 может зависеть от взаимодействия с другими структурными белками или от свойств локальных участков мембраны, которые будут варьировать в клетках различных тканей и органов и даже в разных компартментах одной и той же клетки. Механика клеточной поверхности зависит от взаимодействия с нижележащим цитоскелетом, который может влиять на базовое натяжение или искривление плазматической мембраны. По этим причинам каналы TRPC6 в ножках подоцитов и в теле клетки могут иметь различный характер механочувствительности и активации [70]. Функционирование каналов TRPC6 как механосенсоров коррелирует с распределением экспрессии TRPC6 в тканях, которые подвергаются гидростатическим силам. Как механосенсор TRPC6 является основным кандидатом на роль преобразователя внешних механических сил в активацию внутриклеточных сигнальных каскадов в подоцитах.

Подоцин, как отмечалось выше, играет важную роль в образовании комплекса NOX2–TRPC6 [38]. Кроме того, было показано, что экспрессия экзогенного подоцина значительно усиливает активацию TRPC6, вызванную OAG и стимуляцией GPCR [35]. На основании результатов работы с MEC-2, ортологом подоцина, ответственным за механотрансдукцию в сенсорных нейронах *C. elegans*, было высказано предположение, что подоцин также играет роль в механоактивации TRPC6 [35].

Однако оказалось, что функция подоцина имеет более сложный характер, чем у MEC-2. В то время как GPCR- или OAG-зависимая активация TRPC6 уменьшается или исчезает после нокдауна гена подоцина, механоактивация TRPC6 значительно усиливается [36]. Т.е., одна из функций подоцина может заключаться в подавлении механической активации TRPC6 в подоцитах, что может быть особенно важно в ножках клеток, испытывающих давление со стороны гломерулярных капилляров под действием сил циркулирующей в них жидкости [30, 86, 87]. Как и другие члены семейства стоматин-подобных белков (STOML – Stomatin-like protein), подоцин имеет холестерол-связывающий прохибитин-домен (PHB), также известный как стоматин/прохибитин/флотиллин/HflKC домен [88]. Возможно, что подоцин фиксирует каналы TRPC6 в стерол-обогащенных мембранных доменах, которые могут быть относительно устойчивыми к определенным типам конформационных изменений, вызванных механическими раздражителями. К этому следует добавить, что вызванная растяжением активация TRPC6 в подоцитах усиливается после разрушения F-актина цитохалазином-D [36]. Поскольку подоцин, обладая CD2AP-связывающим мотивом, взаимодействует с цитоскелетом, можно предположить, что последний так или иначе вовлечен в подавление активации TRPC6 растяжением [25]. Таким образом, независимо от того, каков биохимический или биофизический механизм действия подоцина, очевидно, что этот структурный элемент фильтрационного аппарата щелевой диафрагмы модулирует доминантный способ активации TRPC6, т.е. подоцин способствует DAG- и АФК-зависимой и, следовательно, GPCR-зависимой активации TRPC6, но снижает чувствительность ионного канала к механическому воздействию, которое в подоцитах не связано с GPCR. Предположительно, механическая активация TRPC6 может рассматриваться как патофизиологический процесс, происходящий в клетках в силу снижения экспрессии подоцина. Этот структурный белок весьма специфичен, и его экспрессия, кроме гломерулярных подоцитов, была обнаружена только в семенниках [89]. Поэтому подоцин-зависимый тип модуляции TRPC6 является уникальным механизмом в ножках подоцитов. Однако возможно, что и другие белки семейства STOML, имеющие, как подоцин, PHB-домен, также играют сходную роль в модуляции активности каналов семейства TRPC в других тканях [90]. Выше было отмечено, что у *C. elegans* ортолог подоцина, MEC-2, необходим для механической активации катионных каналов из семейства ENaC/Deg, к которому принадлежит эпителиальный натриевый канал (ENaC – Epithelial Sodium Channel) дистального отдела нефрона [35, 91]. Показано, что стоматин в составе комплекса более высокого порядка ингибирует протон-управляемые токи, опосредованные кислото-чувствительными ионными каналами (ASIC – Acid-Sensing Ion Channel) у мышей [92, 93]. Особенно интересно, что STOML-3 усиливает вызванную смещением мембран активацию механочувствительного канала PIEZO1 в нейронах спинальных ганглиев, причем, с порогом активации по смещению мембраны порядка 10 нм [94]. Таким образом, белки с PHB-доменом регулируют механочувствительность клеток, а также доминантный способ активации мультимодальных каналов. Предполагается, что, по крайней мере, часть этих эффектов происходит посредством регуляции натяжения клеточной мембраны в покое [95]. Преобладание того или иного способа активации ионного канала с участием белка с PHB-доменом, вероятно, зависит от особенностей структуры цитоскелета, мембраны и типа канала.

Фосфорилирование белка также играет важную роль в модуляции активности каналов TRPC6. В подоцитах TRPC6 был обнаружен в комплексе, содержащим тирозинкиназу семейства Src, которая фосфорилирует TRPC6 по нескольким аминокислотным остаткам и тем самым увеличивает количество канала на мембране [51, 82]. Среди таких сайтов особенно важным является Y284, поскольку именно фосфорилирование этого аминокислотного остатка необходимо для доставки TRPC6

на клеточную поверхность. Также фосфорилирование Y284 регулирует взаимодействие с другими компонентами щелевой диафрагмы, например нефрином [51]. Кроме того, активация Src в подоцитах происходит в ответ на генерацию АФК [82].

Учитывая, что мутации в TRPC6 связаны с наследственными формами ФСГС, нарушение надлежащей регуляции ионного канала дикого типа при наличии патогенных факторов может быть связано с развитием приобретенных форм ФСГС. Актуальным является вопрос о причинах и механизмах нарушения регуляции TRPC6 у пациентов с ненаследственными формами гломерулярных заболеваний. Например, у пациентов с различными формами ХБП показано увеличение экспрессии TRPC6 дикого типа в гломерулах [96]. Инкубация иммортализованных подоцитов мышей с образцами сыворотки и плазмы, взятыми у пациентов с первичным ФСГС, заболевание которых рецидивировало после трансплантации, вызывала увеличение количества TRPC6 на поверхности клеток и сопровождалось одновременной потерей подоцина [81]. Однако нокдаун подоцина сам по себе не изменял количество TRPC6 на мембране подоцитов. Поэтому вероятно, что эффекты на TRPC6 и подоцин представляют собой независимые друг от друга сигнальные пути. Кроме того, наблюдалось заметное усиление активации каналов TRPC6 за счет растяжения мембраны.

TRPC6 И Ca^{2+}-СИГНАЛИЗАЦИЯ

Поскольку TRPC6 опосредует вход Ca^{2+} в клетку, канал управляет Ca^{2+}-зависимыми сигнальными путями. Принципиально, любой Ca^{2+}- или CaM-зависимый белок, локализованный в пределах доступного диффузионного радиуса, окружающего канал TRPC6, может представлять собой начало нисходящего TRPC6-зависимого сигнального пути. На сегодняшний день известно, что TRPC6-опосредованный вход Ca^{2+} активирует серин/треонин фосфатазу CN (рис. 2) [50]. CN широко экспрессируется клетками многих тканей, становится каталитически активным при взаимодействии с Ca^{2+} или Ca^{2+}-CaM [97, 98] и участвует во множестве сигнальных каскадов. Возможный диапазон сигнальных путей, запускаемых активацией TRPC6, можно оценить по количеству CN-дефосфорилируемых белков, включая компоненты цитоскелета, митоген-активируемые протеинкиназы, белки, вовлеченные в клеточный цикл и апоптоз, ионные каналы и транскрипционные факторы [99, 100]. Хорошо изучен сигнальный путь, приводящий к активации семейства транскрипционных факторов, известных как ядерные факторы активированных Т-клеток (NFAT – Nuclear Factor of Activated T-cells) [50]. Белки семейства NFAT, NFATc1-4 и NFAT5 были первоначально описаны как часть транскрипционного регуляторного комплекса, индуцируемого сигналами в активированных Т-клетках, которые приводят к PLC-зависимому увеличению внутриклеточного Ca^{2+} и активации CaM и CN [101]. Активированный CN дефосфорилирует цитозольный NFAT, вызывая его транслокацию в ядро (рис. 2). Оказавшись внутри ядра, NFAT снова фосфорилируется ядерными киназами, после чего он образует комплексы с другими транскрипционными регуляторными белками [102]. Этот сигнальный путь затрагивается при иммуносупрессии ингибиторами CN, циклоспорином и такролимусом, что подало идею использования этих агентов при нефротических синдромах, таких как первичный ФСГС. В свою очередь, сами каналы TRPC6 также регулируются на уровне транскрипции CN–NFAT-зависимым путем, что порождает положительную обратную связь, которая может вызвать конститутивную активацию TRPC6 (рис. 2) [49, 103,]. Было показано, что именно этот механизм обуславливает Ang II-вызванное увеличение экспрессии TRPC6 в почечных гломерулах [103]. В другой работе была продемонстрирована роль Ang II/TRPC6/NFAT-пути в повреждении подоцитов при развитии диабети-

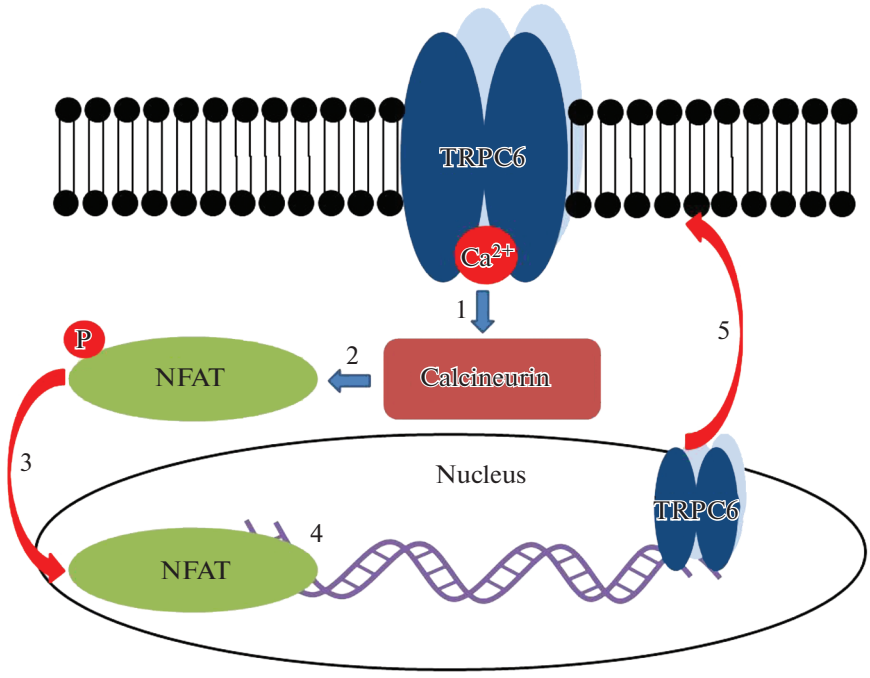

Рис. 2. Схема сигнального каскада активации NFAT.
Вход Ca^{2+} через канал TRPC6 активирует кальцинейрин CN (1). Активированный CN дефосфорилирует цитозольный NFAT (2), вызывая его транслокацию в ядро (3). NFAT стимулирует транскрипцию различных генов, включая TRPC6 (4), что увеличивает количество TRPC6 на клеточной мембране (5).
Источник: [11] с модификациями.
Fig. 2. Scheme of the signaling pathway of activation of NFAT.
Ca^{2+} entry through the TRPC6 channel activates calcineurin CN (1). Activated CN dephosphorylates cytosolic NFAT (2), causing its translocation to the nucleus (3). NFAT stimulates the transcription of various genes including TRPC6 (4), which further increases the TRPC6 surface expression (5).
Source: [11] with modification.

ческой нефропатии. При этом такролимус вызывал снижение экспрессии как TRPC6, так и NFAT и уменьшал степень повреждения подоцитов [104].

TRPC6-зависимые сигнальные пути в ножках подоцитов, вероятно, отличаются от таковых в теле клетки. По-видимому, так же, как и в теле клетки, в ножках вход Ca^{2+} через каналы TRPC6 активирует CN. Активированный CN дефосфорилирует синаптоподин, что обеспечивает его протеолиз катепсином L (рис. 3) [105]. Синаптоподин является регуляторным белком цитоскелета, ответственным за поддержание нормальной морфологии ножек подоцитов [105, 106]. Следовательно, длительная активация TRPC6 и, соответственно, активация CN будет способствовать дестабилизации ножек. В сообщениях о терапии нефротического синдрома предполагается, что именно с воздействием на указанный сигнальный путь связаны защитные эффекты циклоспорина или такролимуса [107, 108]. Т.е. действие этих агентов обусловлено не иммуносупрессией, а, вероятнее всего, стабилизацией ножек и предотвращением отслоения подоцитов [105]. Кроме того, в экспериментах на культивируемых подоцитах было показано, что синаптоподин имеет тенденцию лимитировать количество TRPC6 на клеточной поверхности [109]. Следовательно, как и в случае динамики транскрипции в теле подоцита, длительная акти-

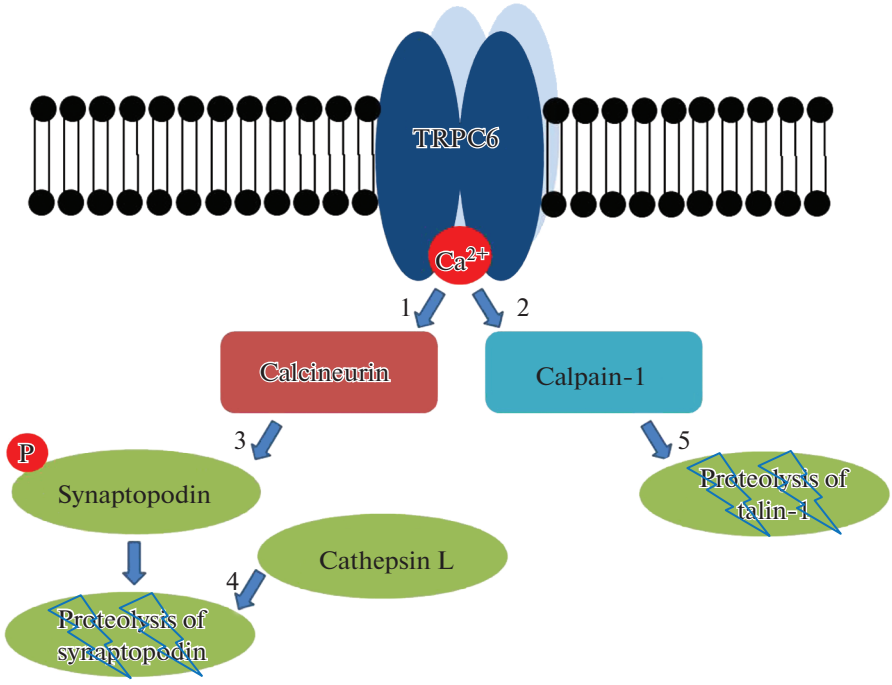

Рис. 3. Схема Ca^{2+}-зависимой активации кальцинейрина и кальпаина.
Вход Ca^{2+} через канал TRPC6 активирует кальцинейрин CN (1) и кальпаин-1 (2). Активированный CN дефосфорилирует синаптоподин (3), что обеспечивает его протеолиз катепсином L (4). Кальпаин-1 осуществляет протеолиз талина-1 (5). Потеря синаптоподина и талина дестабилизирует цитоскелет подоцитов.
Источник: [11] с модификациями.
Fig. 3. Scheme of Ca^{2+}-dependent activation of calcineurin and calpain.
Ca^{2+} entry through the TRPC6 channel activates calcineurin CN (1) and calpain-1 (2). Activated CN dephosphorylates synaptopodin (3), which ensures its proteolysis by cathepsin L (4). Calpain-1 carries out the proteolysis of talin-1 (5). Loss of synaptopodin and talin destabilizes the cytoskeleton of podocytes.
Source: [11] with modification.

вация TRPC6 в ножках может способствовать росту количества каналов на мембране вследствие положительной обратной связи. Вход Ca^{2+} через каналы TRPC6 активирует CN, что обеспечивает протеолиз синаптоподина, это, в свою очередь, дестабилизирует цитоскелет, нарушает морфологию ножек подоцитов и увеличивает число TRPC6 на клеточной мембране.

CN является лишь одной из широкого спектра Ca^{2+}-зависимых сигнальных молекул в подоцитах. Недавнее исследование показало, что TRPC6-зависимый вход Ca^{2+} активирует кальпаин-1 и приводит к структурной дестабилизации и повреждению подоцитов через потерю белка талин-1 и активацию CN (рис. 3) [110]. Кальпаин принадлежит к семейству нелизосомных цистеиновых протеаз, которые активируются ионами Ca^{2+}; его гиперактивность тесно связана с повреждением почек [111]. Талины являются одним из важнейших белков адгезии, соединяющие интегрины с актиновым цитоскелетом [112]. Есть две изоформы талина у позвоночных: талин-1 и талин-2. Талин-1 широко экспрессируется в цитоплазме и может расщепляться кальпаином [113]. Кроме того, TRPC6 может активировать каль-

паин через ERK1/2 Ca^{2+}-независимым образом, тем самым регулируя перестройку цитоскелета, адгезию и подвижность подоцитов [114].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время существует острая потребность в эффективных методах лечения многих форм ХБП. Основу современной терапии составляют подавление ренин-ангиотензиновой системы, иммуносупрессия, лечение дислипидемии и других метаболических и системных нарушений, возникающих в результате почечной дисфункции [115]. Во многих случаях эти подходы в конечном итоге терпят неудачу. Например, часто первичный ФСГС не поддается лечению глюкокортикоидами, прогрессирует до терминальной стадии ХБП [116, 117] и рецидивирует у 40% пациентов, которые получают трансплантат почки [118]. Следовательно, существует сильная мотивация для выявления новых терапевтических мишеней для лечения ХБП [119]. Одной из потенциальных и, возможно, очень перспективных мишеней являются каналы TRPC и, в частности, TRPC6, поскольку анализ экспериментальных и клинических данных свидетельствует, что этот ионный канал играет решающую роль в повреждении подоцитов при заболеваниях почек. Поскольку каналы TRPC имеют достаточно широкое распространение в организме, вполне возможно, что острое фармакологическое ингибирование TRPC6 может привести к негативным побочным эффектам. Например, отмечено, что резкое торможение этих каналов приводит к дефициту когнитивных функций [120–122]. В этом случае существенный вклад в поиск и разработку лекарственных средств вносит изучение механизмов регуляции каналов TRPC в почечных клетках и исследование TRPC-зависимых сигнальных каскадов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 17-15-01292.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weaver D.J., Mitsnefes M.* Cardiovascular disease in children and adolescents with chronic kidney disease. Semin. Nephrol. 38(6): 559–569. 2018.
2. *Taal M.W.* Chronic kidney disease 10 years on: what have we learned? Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 21(6): 607–611. 2012.
3. *Kiefer M.M., Ryan M.J.* Primary care of the patient with chronic kidney disease. Med. Clin. North. Am. 99(5): 935–952. 2015.
4. *Somlo S., Mundel P.* Getting a foothold in nephrotic syndrome. Nat. Genet. 24(4): 333–335. 2000.
5. *Kerjaschki D.* Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. J. Clin. Invest. 108(11): 1583–1587. 2001.
6. *Pena-Polanco J.E., Fried L.F.* Established and emerging strategies in the treatment of chronic kidney disease. Semin. Nephrol. 36(4): 331–342. 2016.
7. *Tryggvason K., Wartiovaara J.* Molecular basis of glomerular permselectivity. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 10(4): 543–549. 2001.
8. *Kaplan J.M., Kim S.H., North K.N., Rennke H., Correia L.A., Tong H.Q., Mathis B.J., Rodríguez-Pérez J.C., Allen P.G., Beggs A.H., Pollak M.R.* Mutations in ACTN4, encoding α-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. Nat. Genet. 24(3): 251–256. 2000.
9. *Fissell W.H., Miner J.H.* What is the glomerular ultrafiltration barrier? J. Am. Soc. Nephrol. 29(9): 2262–2264. 2018.
10. *Kerjaschki D.* Polycation-induced dislocation of slit diaphragms and formation of cell junctions in rat kidney glomeruli: the effects of low temperature, divalent cations, colchicine, and cytochalasin B. Lab. Invest. 39(5): 430–440. 1978.
11. *Hall G., Wang L., Spurney R.F.* TRPC Channels in Proteinuric Kidney Diseases. Cells. 9(1): e44. 2019.

12. *Heeringa S.F., Möller C.C., Du J., Yue L., Hinkes B., Chernin G., Vlangos C.N., Hoyer P.F., Reiser J., Hildebrandt F.* A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. PLoS One. 4(11): e7771. 2009.
13. *Reiser J., Polu K.R., Moller C.C., Herbert S., Villegas I., Vila-Casado C., McGee M., Sugimoto H., Brown D., Kalluri R., Mundel P., Smith P.L., Clapham D.E., Pollak M.R.* TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. Nat. Genet. 37(7): 739–744. 2005.
14. *Winn M.P., Conlon P.J., Lynn K.L., Farrington M.K., Creazzo T., Hawkins A.F., Daskalakis N., Kwan S.Y., Ebersviller S., Burchette J.L., Pericak-Vance M.A., Howell D.N., Vance J.M., Rosenberg P.B.* A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. Science. 308(5729): 1801–1804. 2005.
15. *Montell C., Rubin G.M.* Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. Neuron. 2(4): 1313–1323. 1989.
16. *Pavenstädt H., Kriz W., Kretzler M.* Cell biology of the glomerular podocyte. Physiol. Rev. 83(1): 253–307. 2003.
17. *Wartiovaara J., Öfverstedt L.-G., Khoshnoodi J., Zhang J.J., Mäkelä E., Sandin S., Ruotsalainen V., Cheng R.H., Jalanko H., Skoglund U., Tryggvason K.* Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. J. Clin. Invest. 114(10): 1475–1483. 2004.
18. *Haraldsson B., Nyström J., Deen W.M.* Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. Physiol. Rev. 88(2): 451–487. 2008.
19. *Martin C.E., Jones N.* Nephrin signaling in the podocyte: An updated view of signal regulation at the slit diaphragm and beyond. Front. Endocrinol. (Lausanne). 9: 302. 2018.
20. *Reiser J., Kriz W., Kretzler M., Mundel P.* The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. J. Am. Soc. Nephrol. 11(1): 1–8. 2000.
21. *Schnabel E., Anderson J.M., Farquhar M.G.* The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. J. Cell. Biol. 111(3): 1255–1263. 1990.
22. *Ruotsalainen V., Ljungberg P., Wartiovaara J., Lenkkeri U., Kestilä M., Jalanko H., Holmberg C., Tryggvason K.* Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96(14): 7962–7967. 1999.
23. *Sellin L., Huber T.B., Gerke P., Quack I., Pavenstädt H., Walz G.* NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. FASEB J. 17(1): 115–117. 2003.
24. *Grahammer F., Wigge C., Schell C., Kretz O., Patrakka J., Schneider S., Klose M., Kind J., Arnold S.J., Habermann A., Bräuniger R., Rinschen M.M., Völker L., Bregenzer A., Rubbenstroth D., Boerries M., Kerjaschki D., Miner J.H., Walz G., Benzing T., Fornoni A., Frangakis A.S., Huber T.B.* A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. J. CIin. Insight. 1(9): e86177. 2016.
25. *Schwarz K., Simons M., Reiser J., Saleem M.A., Faul C., Kriz W., Shaw A.S., Holzman L.B., Mundel P.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. J. Clin. Invest. 108(11): 1621–1629. 2001.
26. *Kriz W., Shirato I., Nagata M., LeHir M., Lemley K.V.* The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 304(4): 333–347. 2013.
27. *Kim Y.H., Goyal M., Kurnit D., Wharram B., Wiggins J., Holzman L., Kershaw D., Wiggins R.* Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. Kidney Int. 60(3): 957–968. 2001.
28. *Kriz W., Elger M., Hosser H., Hähnel B., Provoost A., Kränzlin B., Gretz N.* How does podocyte damage result in tubular damage? Kidney Blood Press. Res. 22(1–2): 26–36. 1999.
29. *Kriz W., Lemley K.V.* A potential role for mechanical forces in the detachment of podocytes and the progression of CKD. J. Am. Soc. Nephrol. 26(2): 258–269. 2015.
30. *Kriz W., Lemley K.V.* Potential relevance of shear stress for slit diaphragm and podocyte function. Kidney Int. 91(6): 1283–1286. 2017.
31. *Goel M., Sinkins W.G., Zuo C.D., Estacion M., Schilling W.P.* Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 290(5): 1241–1252. 2006.
32. *Ilatovskaya D.V., Levchenko V., Ryan R.P., Cowley A.W. Jr., Staruschenko A.* NSAIDs acutely inhibit TRPC channels in freshly isolated rat glomeruli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 408(2): 242–247. 2011.
33. *Ilatovskaya D.V., Staruschenko A.* TRPC6 channel as an emerging determinant of the podocyte injury susceptibility in kidney diseases. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 309(5): 393-397. 2015.
34. *Tian D., Jacobo S.M., Billing D., Rozkalne A., Gage S.D., Anagnostou T., Pavenstadt H., Hsu H.H., Schlondorff J., Ramos A., Greka A.* Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. Sci. Signal. 3(145): ra77. 2010.
35. *Huber T.B., Schermer B., Müller R.U., Höhne M., Bartram M., Calixto A., Hagmann H., Reinhardt C., Koos F., Kunzelmann K., Shirokova E., Krautwurst D., Harteneck C., Simons M., Pavenstädt H., Kerjaschki D., Thiele C., Walz G., Chalfie M., Benzing T.* Podocin and MEC-2

bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103(46): 17079–17086. 2006.

36. *Anderson M., Kim E.Y., Hagmann H., Benzing T., Dryer S.E.* Opposing effects of podocin on the gating of podocyte TRPC6 channels evoked by membrane stretch or diacylglycerol. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 305(3): 276–289. 2013.
37. *Kim E.Y., Choi K.J., Dryer S.E.* Nephrin binds to the COOH terminus of a largeconductance Ca^{2+}-activated K^{+} channel isoform and regulates its expression on the cell surface. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 295(1): 235–246. 2008.
38. *Kim E.Y., Anderson M., Wilson C., Hagmann H., Benzing T., Dryer S.E.* NOX2 interacts with podocyte TRPC6 channels and contributes to their activation by diacylglycerol: essential role of podocin in formation of this complex. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 305(9): 960–971. 2013.
39. *Dryer S.E., Reiser J.* TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 299(4): 689–701. 2010.
40. *Roselli S., Gribouval O., Boute N., Sich M., Benessy F., Attié T., Gubler M.C., Antignac C.* Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. Am. J. Pathol. 60(1): 131–139. 2002.
41. *Quick K., Zhao J., Eijkelkamp N., Linley J.E., Rugiero F., Cox J.J., Raouf R., Gringhuis M., Sexton J.E., Abramowitz J., Taylor R., Forge A., Ashmore J., Kirkwood N., Kros C.J., Richardson G.P., Freichel M., Flockerzi V., Birnbaumer L., Wood J.N.* TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells. Open Biol. 2(5): 120068. 2012.
42. *Winn M.P., Conlon P.J., Lynn K.L., Howell D.N., Slotterbeck B.D., Smith A.H., Graham F.L., Bembe M., Quarles L.D., Pericak-Vance M.A., Vance J.M.* Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. Genomics. 58(2): 113–120. 1999.
43. *Santín S., Ars E., Rossetti S., Salido E., Silva I., García-Maset R., Giménez I., Ruíz P., Mendizábal S., Luciano Nieto J., Peña A., Camacho J.A., Fraga G., Cobo M.A., Bernis C., Ortiz A., de Pablos A.L., Sánchez-Moreno A., Pintos G., Mirapeix E., Fernández-Llama P., Ballarín J., Torra R., Zamora I., López-Hellin J., Madrid A., Ventura C., Vilalta R., Espinosa L., García C., Melgosa M., Navarro M., Giménez A., Cots J.V., Alexandra S., Caramelo C., Egido J., San José M.D., de la Cerda F., Sala P., Raspall F., Vila A., Daza A.M., Vázquez M., Ecija J.L., Espinosa M., Justa M.L., Poveda R., Aparicio C., Rosell J., Muley R., Montenegro J., González D., Hidalgo E., de Frutos D.B., Trillo E., Gracia S., de los Ríos F.J.* TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. Nephrol. Dial. Transplant. 24(10): 3089–3096. 2009.
44. *Zhu B., Chen N., Wang Z.H., Pan X.X., Ren H., Zhang W., Wang W.M.* Identification and functional analysis of a novel TRPC6 mutation associated with late onset familial focal segmental glomerulosclerosis in Chinese patients. Mutat. Res. 664(1–2): 84–90. 2009.
45. *Gigante M., Caridi G., Montemurno E., Soccio M., d'Apolito M., Cerullo G., Aucella F., Schirinzi A., Emma F., Massella L., Messina G., De Palo T., Ranieri E., Ghiggeri G.M., Gesualdo L.* TRPC6 mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome and atypical phenotype. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 6(7): 1626–1634. 2011.
46. *Hofstra J.M., Lainez S., van Kuijk W.H., Schoots J., Baltissen M.P., Hoefsloot L.H., Knoers N.V., Berden J.H., Bindels R.J., van der Vlag J., Hoenderop J.G., Wetzels J.F., Nijenhuis T.* New TRPC6 gain-of-function mutation in a non-consanguineous Dutch family with late-onset focal segmental glomerulosclerosis. Nephrol. Dial. Transplant. 28(7): 1830–1838. 2013.
47. *Riehle M., Büscher A.K., Gohlke B.O., Kaßmann M., Kolatsi-Joannou M., Bräsen J.H., Nagel M., Becker J.U., Winyard P., Hoyer P.F., Preissner R., Krautwurst D., Gollasch M., Weber S., Harteneck C.* TRPC6 G757D loss-of-function mutation associates with FSGS. J. Am. Soc. Nephrol. 27(9): 2771–2783. 2016.
48. *Chiluiza D., Krishna S., Schumacher V.A., Schlondorff J.* Gain-of-function mutations in transient receptor potential C6 (TRPC6) activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2). J. Biol. Chem. 288(25): 18407–18420. 2013.
49. *Schlöndorff J., Del Camino D., Carrasquillo R., Lacey V., Pollak M.R.* TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 296(3): 558-569. 2009.
50. *Wang Y., Jarad G., Tripathi P., Pan M., Cunningham J., Martin D.R., Liapis H., Miner J.H., Chen F.* Activation of NFAT signaling in podocytes causes glomerulosclerosis. J. Am. Soc. Nephrol. 21(10): 1657-1666. 2010.
51. *Kanda S., Harita Y., Shibagaki Y., Sekine T., Igarashi T., Inoue T., Hattori S.* Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC-γ1 and nephrin: effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. Mol. Biol. Cell. 22(11): 1824–1835. 2011.
52. *Buscher A.K., Kranz B., Buscher R., Hildebrandt F., Dworniczak B., Pennekamp P., Kuwertz-Bröking E., Wingen A.M., John U., Kemper M., Monnens L., Hoyer P.F., Weber S., Konrad M.* Immunosuppression and renal outcome in congenital and pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 5(11): 2075–2084. 2010.

53. *Obeidova L., Reiterova J., Lnenicka P., Stekrova J., Safrankova H., Kohoutova M., Tesař V.* TRPC6 gene variants in Czech adult patients with focal segmental glomerulosclerosis and minimal change disease. Folia. Biol. 58(4): 173–176. 2012.
54. *Mir S., Yavascan O., Berdeli A., Sozeri B.* TRPC6 gene variants in Turkish children with steroid-resistant nephrotic syndrome. Nephrol. Dial. Transplant. 27(1): 205–209. 2012.
55. *Barua M., Brown E.J., Charoonratana V.T., Genovese G., Sun H., Pollak M.R.* Mutations in the INF2 gene account for a significant proportion of familial but not sporadic focal and segmental glomerulosclerosis. Kidney Int. 83(2): 316–322. 2013.
56. *Santin S., Ars E., Rossett S., Salido E., Silva I., Garcia-Maset R. Giménez I., Ruíz P., Mendizábal S., Luciano Nieto J., Peña A., Camacho J.A., Fraga G., Cobo M.A., Bernis C., Ortiz A., de Pablos A.L., Sánchez-Moreno A., Pintos G., Mirapeix E., Fernández-Llama P., Ballarín J., Torra R., Zamora I., López-Hellin J., Madrid A., Ventura C., Vilalta R., Espinosa L., García C., Melgosa M., Navarro M., Giménez A., Cots J.V., Alexandra S., Caramelo C., Egido J., San José M.D., de la Cerda F., Sala P., Raspall F., Vila A., Daza A.M., Vázquez M., Ecija J.L., Espinosa M., Justa M.L., Poveda R., Aparicio C., Rosell J., Muley R., Montenegro J., González D., Hidalgo E., de Frutos D.B., Trillo E., Gracia S., de los Ríos F.J.* TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. Nephrol. Dial. Transplant. 24(10): 3089–3096. 2009.
57. *Buscher A.K., Konrad M., Nagel M., Witzke O., Kribben A., Hoyer P.F., Weber S.* Mutations in podocyte genes are a rare cause of primary FSGS associated with ESRD in adult patients. Clin. Nephrol. 78(1): 47–53. 2012.
58. *Gheissari A., Meamar R., Kheirollahi M., Rouigari M., Dehbashi M., Dehghani L., Abedini A.* TRPC6 mutational analysis in Iranian children with focal segmental glomerulosclerosis. Iran J. Kidney Dis. 12(6): 341–349. 2018.
59. *Anderson M., Roshanravan H., Khine J., Dryer S.E.* Angiotensin II activation of TRPC6 channels in rat podocytes requires generation of reactive oxygen species. J. Cell. Physiol. 229(4): 434–442. 2014.
60. *Taal M.W., Brenner B.M.* Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. Kidney Int. 57(5):1803-1817. 2000.
61. *Balla T., Varnai P., Tian Y., Smith R.D.* Signaling events activated by angiotensin II receptors: what goes before and after the calcium signals. Endocr. Res. 24(3-4): 335-344. 1998.
62. *Hoffmann S., Podlich D., Hähnel B., Kriz W., Gretz N.* Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. J. Am. Soc. Nephrol. 15(6):1475–1487. 2004.
63. *Roshanravan H., Dryer S.E.* ATP acting through P2Y receptors causes activation of podocyte TRPC6 channels: role of podocin and reactive oxygen species. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 306(9): 1088–1097. 2014.
64. *Hofmann T., Obukhov A.G., Schaefer M., Harteneck C., Gudermann T., Schultz G.* Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. Nature. 397(6716): 259–263. 1999.
65. *Bousquet S.M., Monet M., Boulay G.* Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. J. Biol. Chem. 285(52): 40534–40543. 2010.
66. *Kim E.Y., Anderson M., Dryer S.E.* Insulin increases surface expression of TRPC6 channels in podocytes: role of NADPH oxidases and reactive oxygen species. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 302(3): 298–307. 2012.
67. *Cayouette S., Lussier M.P., Mathieu E.L., Bousquet S.M., Boulay G.* Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. J. Biol. Chem. 279(8): 7241–7246. 2004.
68. *Roshanravan H., Kim E.Y., Dryer S.E.* 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) modulates canonical transient receptor potential-6 (TRPC6) channels in podocytes. Front. Physiol. 7: 351. 2016.
69. *Basora N., Boulay G., Bilodeau L., Rousseau E., Payet M.D.* 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. J. Biol. Chem. 278(34): 31709–31716. 2003.
70. *Dryer S.E., Roshanravan H., Kim E.Y.* TRPC channels: Regulation, dysregulation and contributions to chronic kidney disease. Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis. 1865(6): 1041–1066. 2019.
71. *Huber T.B., Simons M., Hartleben B., Sernetz L., Schmidts M., Gundlach E., Saleem M.A., Walz G., Benzing T.* Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. Hum. Mol. Genet. 12(24): 3397–3405. 2003.
72. *Burnham D.N., Uhlinger D.J., Lambeth J.D.* Diradylglycerol synergizes with an anionic amphiphile to activate superoxide generation and phosphorylation of p47phox in a cell-free system from human neutrophils. J. Biol. Chem. 265(29): 17550–17559. 1990.

73. *Park J.W., Babior B.M.* The translocation of respiratory burst oxidase components from cytosol to plasma membrane is regulated by guanine nucleotides and diacylglycerol. J. Biol. Chem. 267(28): 19901–19906. 1992.
74. *Qualliotine-Mann D., Agwu D.E., Ellenburg M.D., McCall C.E., McPhail L.C.* Phosphatidic acid and diacylglycerol synergize in a cell-free system for activation of NADPH oxidase from human neutrophils. J. Biol. Chem. 268(32): 23843–23849. 1993.
75. *Tyagi S.R., Neckelmann N., Uhlinger D.J., Burnham D.N., Lambeth J.D.* Cell-free translocation of recombinant p47-phox, a component of the neutrophil NADPH oxidase: effects of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate), diacylglycerol, and an anionic amphiphile. Biochemistry. 31(10): 2765–2774. 1992.
76. *Ogawa N., Kurokawa T., Mori Y.* Sensing of redox status by TRP channels. Cell. Calcium. 60(2): 115–122. 2016.
77. *Kozai D., Ogawa N., Mori Y.* Redox regulation of transient receptor potential channels. Antioxid. Redox Signal. 21(6): 971–986. 2014.
78. *Samanta A., Kiselar J., Pumroy R.A., Han S., Moiseenkova-Bell V.Y.* Structural insights into the molecular mechanism of mouse TRPA1 activation and inhibition. J. Gen. Physiol. 150(5): 751–762. 2018.
79. *Pires P.W., Earley S.* Redox regulation of transient receptor potential channels in the endothelium. Microcirculation. 2017 Apr; 24(3):10.1111/micc.12329. https://doi.org/10.1111/micc.12329
80. *Bouron A., Chauvet S., Dryer S.E., Rosado J.A.* Second messenger-operated calcium entry through TRPC6. Adv. Exp. Med. Biol. 898: 201–249. 2016.
81. *Kim E.Y., Roshanravan H., Dryer S.E.* Changes in podocyte TRPC channels evoked by plasma and sera from patients with recurrent FSGS and by putative glomerular permeability factors. Biochim. Biophys. Acta. Mol. basis Dis. 1863(9): 2342–2354. 2017.
82. *Kim E.Y., Hassanzadeh Khayyat N., Dryer S.E.* Mechanisms underlying modulation of podocyte TRPC6 channels by suPAR: role of NADPH oxidases and Src family tyrosine kinases. Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis. 1864(10): 3527–3536. 2018.
83. *Patel A., Sharif-Naeini R., Folgering J.R., Bichet D., Duprat F., Honoré E.* Canonical TRP channels and mechanotransduction: from physiology to disease states. Pflugers Arch. 460(3): 571–581. 2010.
84. *Wilson C., Dryer S.E.* A mutation in TRPC6 channels abolishes their activation by hypoosmotic stretch but does not affect activation by diacylglycerol or G protein signaling cascades. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 306(9): 1018–1025. 2014.
85. *Spassova M.A., Hewavitharana T., Xu W., Soboloff J., Gill D.L.* A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103(44): 16586–16591. 2006.
86. *Brenner B.M., Troy J.L., Daugharty T.M.* The dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. J. Clin. Invest. 50(8): 1776–1780. 1971.
87. *Endlich N., Endlich K.* The challenge and response of podocytes to glomerular hypertension. Semin. Nephrol. 32(4): 327–341. 2012.
88. *Browman D.T., Hoegg M.B., Robbins S.M.* The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. Trends Cell. Biol. 17(8): 394–402. 2007.
89. *Relle M., Cash H., Brochhausen C., Strand D., Menke J., Galle P.R., Schwarting A.* New perspectives on the renal slit diaphragm protein podocin. Mod. Pathol. 24(8): 1101–1110. 2011.
90. *Moshourab R.A., Wetzel C., Martinez-Salgado C., Lewin G.R.* Stomatin-domain protein interactions with acid-sensing ion channels modulate nociceptor mechanosensitivity. J. Physiol. 591(22): 5555–5574. 2013.
91. *O'Hagan R., Chalfie M., Goodman M.B.* The MEC-4 DEG/ENaC channel of Caenorhabditis elegans touch receptor neurons transduces mechanical signals. Nat. Neurosci. 8(1): 43–50. 2005.
92. *Price M.P., Thompson R.J., Eshcol J.O., Wemmie J.A., Benson C.J.* Stomatin modulates gating of acid-sensing ion channels. J. Biol. Chem. 279(51): 53886–53891. 2004.
93. *Brand J., Smith E.S., Schwefel D., Lapatsina L., Poole K., Omerbašić D., Kozlenkov A., Behlke J., Lewin G.R., Daumke O.* A stomatin dimer modulates the activity of acid-sensing ion channels. EMBO J. 31(17): 3635–3646. 2012.
94. *Poole K., Herget R., Lapatsina L., Ngo H.D., Lewin G.R.* Tuning Piezo ion channels to detect molecular-scale movements relevant for fine touch. Nat. Commun. 5: 3520. 2014.
95. *Lewis A.H., Grandl J.* Mechanical sensitivity of Piezo1 ion channels can be tuned by cellular membrane tension. Elife. 4: e12088. 2015.
96. *Möller C.C., Wei C., Altintas M.M., Li J., Greka A., Ohse T., Pippin J.W., Rastaldi M.P., Wawersik S., Schiavi S., Henger A., Kretzler M., Shankland S. J., Reiser J.* Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. J. Am. Soc. Nephrol. 18(1): 29–36. 2007.
97. *Rusnak F., Mertz P.* Calcineurin: form and function. Physiol. Rev. 80(4): 1483–1521. 2000.

98. *Klee C.B., Crouch T.H., Krinks M.H.* Calcineurin: a calcium- and calmodulinbinding protein of the nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(12): 6270–6273. 1979.
99. *Li H., Rao A., Hogan P.G.* Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. Trends Cell. Biol. 21(2): 91–103. 2011.
100. *Song R., Li J., Zhang J., Wang L., Tong L., Wang P., Yang H., Wei Q., Cai H., Luo J.* Peptides derived from transcription factor EB bind to calcineurin at a similar region as the NFAT-type motif. Biochimie. 142: 158–167. 2017.
101. *Macian F.* NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. Nat. Rev. Immunol. 5(6): 472–484. 2005.
102. *Müller M.R., Rao A.* NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. Nat. Rev. Immunol. 10(9): 645–656. 2010.
103. *Nijenhuis T., Sloan A.J., Hoenderop J.G., Flesche J., van Goor H., Kistler A.D., Bakker M., Bindels R.J., de Boer R.A., Möller C.C., Hamming I., Navis G., Wetzels J.F., Berden J.H., Reiser J., Faul C., van der Vlag J.* Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRPC6 expression via an NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. Am. J. Pathol. 179(4): 1719–1732. 2011.
104. *Ma R., Liu L., Jiang W., Yu Y., Song H.* FK506 ameliorates podocyte injury in type 2 diabetic nephropathy by down-regulating TRPC6 and NFAT expression. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 8(11): 14063–14074. 2015.
105. *Faul C., Donnelly M., Merscher-Gomez S., Chang Y.H., Franz S., Delfgaauw J., Chang J.M., Choi H.Y., Campbell K.N., Kim K., Reiser J., Mundel P.* The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. Nat. Med. 14(9): 931–938. 2008.
106. *Asanuma K., Yanagida-Asanuma E., Faul C., Tomino Y., Kim K., Mundel P.* Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signaling. Nat. Cell. Biol. 8(5): 485–491. 2006.
107. *Gellermann J., Stefanidis C.J., Mitsioni A., Querfeld U.* Successful treatment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with WT1 mutations. Pediatr. Nephrol. 25(7): 1285–1289. 2010.
108. *Malina M., Cinek O., Janda J., Seeman T.* Partial remission with cyclosporine A in a patient with nephrotic syndrome due to NPHS2 mutation. Pediatr. Nephrol. 24(10): 2051–2053. 2009.
109. *Yu H., Kistler A., Faridi M.H., Meyer J.O., Tryniszewska B., Mehta D., Yue L., Dryer S.E., Reiser J.* Synaptopodin limits TRPC6 podocyte surface expression and attenuates proteinuria. J. Am. Soc. Nephrol. 27(11): 3308–3319. 2016.
110. *Verheijden K.A.T., Sonneveld R., Bakker-van Bebber M., Wetzels J.F.M., van der Vlag J., Nijenhuis T.* The calcium-dependent protease calpain-1 links TRPC6 activity to podocyte injury. J. Am. Soc. Nephrol. 29(8): 2099–2109. 2018.
111. *Peltier J., Bellocq A., Perez J., Doublier S., Dubois Y.C., Haymann J.P., Camussi G., Baud L.* Calpain activation and secretion promote glomerular injury in experimental glomerulonephritis: evidence from calpastatin-transgenic mice. J. Am. Soc. Nephrol. 17(12): 3415–3423. 2006.
112. *Gough R.E., Goult B.T.* The tale of two talins - two isoforms to fine-tune integrin signaling. FEBS Letters. 592(12): 2108–2125. 2018.
113. *Franco S.J., Rodgers M.A., Perrin B.J., Han J., Bennin D.A., Critchley D.R., Huttenlocher A.* Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. Nature. Cell. Biol. 6(10): 977–983. 2004.
114. *Farmer L.K., Rollason R., Whitcomb D.J., Ni L., Goodliff A., Lay A.C., Birnbaumer L., Heesom K.J., Xu S.Z., Saleem M.A., Welsh G.I.* TRPC6 binds to and activates calpain, independent of its channel activity, and regulates podocyte cytoskeleton, cell adhesion, and motility. J. Am. Soc. Nephrol. 30(10): 1910–1924. 2019.
115. *Turner J.M., Bauer C., Abramowitz M.K., Melamed M.L., Hostetter T.H.* Treatment of chronic kidney disease. Kidney Int. 81(4): 351–362. 2012.
116. *Hogan J., Radhakrishnan J.* The treatment of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in adults. Adv. Chronic Kidney Dis. 21(5): 434–441. 2014.
117. *Rosenberg A.Z., Kopp J.B.* Focal segmental glomerulosclerosis. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 12(3): 502–517. 2017.
118. *Leca N.* Focal segmental glomerulosclerosis recurrence in the renal allograft. Adv. Chronic Kidney Dis. 21(5): 448–452. 2014.
119. *Breyer M.D., Susztak K.* The next generation of therapeutics for chronic kidney disease. Nat. Rev. Drug Discov. 15(8): 568–588. 2016.
120. *Qin X., Liu Y., Zhu M., Yang Z.* The possible relationship between expressions of TRPC3/5 channels and cognitive changes in rat model of chronic unpredictable stress. Behav. Brain Res. 290: 180–186. 2015.

121. *Liu Y., Liu C., Qin X., Zhu M., Yang Z.* The change of spatial cognition ability in depression rat model and the possible association with down-regulated protein expression of TRPC6. Behav. Brain Res. 294: 186–193. 2015.
122. *Bröker-Lai J., Kollewe A., Schindeldecker B., Pohle J., Nguyen Chi V., Mathar I., Guzman R., Schwarz Y., Lai A., Weißgerber P., Schwegler H., Dietrich A., Both M., Sprengel R., Draguhn Köhr G., Fakler B., Flockerzi V., Bruns D., Freichel M.* Heteromeric channels formed by TRPC1, TRPC4 and TRPC5 define hippocampal synaptic transmission and working memory. EMBO J. 36(18): 2770–2789. 2017.

TRPC6 Channel in Podocytes of the Renal Glomeruli

V. B. Mikhailova[a], *, A. V. Karpushev[a], and Yu. S. Yudina[a]

[a] *Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia*
**e-mail: hastar.teerend@yandex.ru*

The most important component of the filtration apparatus of the renal glomeruli is specialized visceral epithelial cells podocytes. The normal physiological function of podocytes is critically dependent on the proper regulation of the intracellular Ca^{2+} content; excessive Ca^{2+} influx in cells can lead to a disorder of cell morphology, podocytopathy, apoptosis and subsequent glomeruli damage. Podocytopathy is one of the primary characteristics of proteinuria and focal segmental glomerulosclerosis. One of the key proteins responsible for Ca^{2+} influx in podocytes is the TRPC6 channel. Since the first discovery of a mutation in a gene encoding TRPC6, the attention of the scientific community has been focused on studying the role of this ion channel in the onset and development of kidney diseases. Both an increase and a decrease in the functional activity of TRPC6 are associated with the manifestation of severe nephrotic syndromes leading to the end-stage of chronic kidney disease. The review contains materials related to the regulation of TRPC6 activity and the role of this channel in the pathogenesis of glomerular diseases.

Keywords: kidney, glomerulus, podocyte, FSGS, TRPC channels, Ca^{2+} signaling

ЦИТИРОВАТЬ:

Михайлова В.Б., Карпушев А.В., Юдина Ю.С. Канал TRPC6 в подоцитах почечных гломерул. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(2): 135–153. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020035

TO CITE THIS ARTICLE:

Mikhailova V.B., Karpushev A.V., Yudina Yu.S. TRPC6 channel in podocytes of the renal glomeruli. Russian Journal of Physiology. 107(1): 135–153. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020035

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 2, с. 154–176

ОБЗОРЫ

ФИЗИОЛОГИЯ И ПСИХОЛОГИЯ – ДИАЛЕКТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ РЕШЕНИИ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЛЕМЫ

© 2021 г. А. Д. Ноздрачев[1, 2, *], Ю. В. Щербатых[3]

[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[2]Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия
[3]Воронежский филиал Московского Гуманитарно-экономического университета, Воронеж, Россия
**E-mail: a.d.nozdrachev@mail.ru*

Поступила в редакцию 27.11.2020 г.
После доработки 13.12.2020 г.
Принята к публикации 18.12.2020 г.

Обзор посвящен истории решения одной из самых фундаментальных проблем человечества: каким образом материальный мозг рождает психику, лишенную атрибутов материальности? Речь идет о так называемой “психофизической” или “психофизиологической” проблеме (“mind-body problem”). В статье проводится аналитический разбор различных подходов и концепций, с помощью которых представители разных наук на протяжении более двух тысяч лет пытались решить эту загадку. Акцент делается на две науки – психологию и физиологию, в рамках которых психологи и физиологи искали решение психофизической проблемы, исходя из принципов и методов своей науки. В статье показано, что успехи в области нейрофизиологии и нейробиологии медленно, но неизбежно приближают нас к решению “трудной проблемы сознания”, в то время как описательные и умозрительные подходы философов и психологов до настоящего времени не позволили сами по себе вскрыть принципы работы психики и понять механизмы ее формирования мозгом. Тем не менее, авторы статьи считают, что только совместная работа физиологов и психологов по общему плану, с выработкой единой концепции поиска истины и в тесной кооперации с представителями других нейронаук, может привести человечество к разгадке великой тайны природы: открытию принципов и механизмов работы психики и сознания.

Ключевые слова: психика, сознание, психофизическая проблема, психофизиологическая проблема, мозг и сознание, мозг и психика, нейронауки, нейрофизиология, психофизиология, трудная проблема сознания

DOI: 10.31857/S0869813921020047

За все время существования науки человечеством был достигнут огромный прогресс в познании природы, который находится в вопиющем противоречии с нашим пониманием того, как мозг человека создает психику. Телескоп Хаббл находит экзопланеты в глубинах космоса, адронный коллайдер изучает уже не атомы, а частицы, из которых они созданы, но ученые пока достаточно смутно понимают что такое психика и, тем более – сознание человека. Парадокс заключается в том, что каждый из нас обладает мозгом и отдает отчет о тех психических явлениях, которые в нем происходят, но в то же время пока непонятно, как вполне “вещественный” нейрокомпьютер под названием мозг рождает “виртуальные” процессы, которые невозможно зарегистрировать ни одним прибором.

Среди разных наук о человеке на две из них возлагается особая роль в понимании природы психических явлений – это физиология и психология. Каждая из них пыталась своими методами решить так называемую "психофизиологическую проблему", но безрезультатность этих попыток наводит на мысль, что только реальная и глубокая интеграция этих двух наук может дать человечеству шанс понять само себя.

"Психофизиологическая", или как ее еще называют "психофизическая" проблема ("mind-body problem"), заключается в том, что в настоящее время в науке отсутствуют убедительные гипотезы, объясняющие, как объективно регистрируемые мозговые процессы порождают субъективную психику, лишенную атрибутов материальности. С одной стороны, перед психологией и физиологией стоит одна и та же задача: понимание принципов работы человеческого мозга, но препятствием на пути результативной кооперации этих двух отраслей научного познания является то, что они используют разный терминологический аппарат, разные методы и самое главное – разное понимание того, в чем заключается работа мозга. Но поскольку ни одной из этих наук до настоящего времени не удалось сформулировать достаточно обоснованную рабочую гипотезу, объясняющую возникновение психических явлений, то возникает настоятельная потребность объединить усилия физиологов и психологов в решении данной глобальной задачи.

В данной статье мы хотим провести краткий обзор предыдущих попыток физиологов и психологов решить психофизиологическую проблему, а также наметить перспективы будущего взаимодействия этих наук. При этом мы сосредоточимся не на всей физиологии, изучающей разнообразные процессы, протекающие в живом организме, а на одной из ее областей – нейрофизиологии, которую в данной статье для краткости и удобства восприятии будем условно называть просто "физиологией".

ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РАБОТЫ МОЗГА ОТ АНТИЧНОСТИ ДО КОНЦА XIX ВЕКА

Первыми на заре человеческой цивилизации психику начали изучать философы, от которых со временем отделились уже собственно психологи. Основателем психологии считается Аристотель, написавший первый трактат о психических явлениях [1]. По его мнению, душа есть форма реализации способного к жизни тела, а ее высшая форма – "разумная душа" идеальна, отделима от тела и имеет божественную сущность. И уже со времен Аристотеля стала заметна разница подходов в изучении мозга "философами/психологами", с одной стороны, и "естествоиспытателями/физиологами" – с другой. Ибо научное познание первых реализуется в основном через размышление и воображение, а вторых – через обязательную эмпирическую проверку выдвигаемых гипотез. Поэтому Аристотель, наблюдая, как сердце чутко реагирует на наши душевные переживания, посчитал именно его, а не мозг, органом души.

Взгляды Аристотеля на источник психики господствовали почти пятьсот лет, и понадобились эксперименты "физиолога" Галена, чтобы понять роль мозга и нервов в генерации психических процессов. Галена по праву можно считать основоположником нейрофизиологии, так как именно он доказал, что мозг, а не сердце, является "средоточием движения, чувствительности и душевной деятельности" [2]. Перерезав спинной мозг, Гален продемонстрировал исчезновение чувствительности частей тела, лежащих ниже места разреза, а также он сделал вывод о том, что нервы обеспечивают произвольные движения и чувства. Ему принадлежит известное высказывание: "Без нерва нет ни одной части тела, ни одного движения, называемого произвольным, ни единого чувства". Проводя опыты с перерезкой корешков спинного мозга свиней, Гален впервые показал, что информация поступает в мозг по задним (дорзальным) корешкам, а управление движениями осуществляет-

ся по передним. Таким образом, начиная с античности, мы можем видеть два различных подхода к познанию мозга и психики: рассуждения и эксперимент, и именно эти два методологических подхода стали основными у психологов и физиологов.

Мысль о том, что именно мозг является источником сознания человека, впервые была отмечена древнегреческим врачом Алкмеоном Кротонским, а затем подтверждена Гиппократом. Последний в трактате об эпилепсии ("О священной болезни") отмечал, что "мы мыслим мозгом". В этой работе он писал: "Человек должен в полной мере осознать тот факт, что именно из мозга – и только из мозга – происходят наши ощущения радости, удовольствия, веселья, так же как наши печаль, боль, скорбь, слезы" [3, стр. 249]. Однако авторитет Аристотеля был столь велик, что еще многие столетия после него роль нервной системы и мозга в формирования сознания считалась второстепенной по сравнению с сердцем.

Психофизиологическая проблема стала объектом изучения ученых в XVII столетии благодаря работам Рене Декарта. Методов экспериментальной психологии и физиологии тогда еще не существовало, поэтому Декарт прибег к методу "интроспекции" – то есть наблюдения за собственными психическими процессами и рассуждениями на их счет. Выгоды такого подхода состоят в том, что он позволяет создавать любые гипотезы, способные объяснить что угодно (так Декарт, в частности, обосновал существования Бога), а главным недостатком этого метода является отказ от поиска способов проверки фактов, способных подтвердить или опровергнуть размышления ученого. Физиологи отдают дань уважения Рене Декарту за описание принципа рефлекса, но следует понимать, что представление об ответной реакции организма на раздражение у Декарта было далеко от реального. В духе того времени он представлял тело человека как механизм, однозначно реагирующий на определенные раздражители, причем психика человека (а точнее его сознание) не принимала в этом участие, существуя в совершенно иной, идеальной реальности. По сути, подход Декарта к психофизической проблеме был решен в форме дуализма: то, что нельзя было объяснить рефлексами, объяснялось деятельностью божественной и изначально непознаваемой души. Согласно воззрениям Декарта на психофизическое взаимодействие, тело может влиять на душу, вызывая в ней эмоции и чувственное восприятие мира, а душа, обладая свободой воли, заставляет тело совершать те или иные действия – но это две независимые сущности, живущие по своим законам. Если принять за основу гипотезу Декарта о психофизическом параллелизме, то необходимость решения психофизической проблемы пропадает, ибо предметы двух наук – психологии и физиологии лежат в разных, не пересекающихся плоскостях. Такая позиция снимает вопрос соотношения мозга и сознания, но и не представляет нам никакого шанса для прогресса в деле познания человеком загадки своей психической жизни.

Взглядам Декарта свою концепцию взаимодействия души и тела противопоставил английский естествоиспытатель Томас Гоббс, который полагал, что для объяснения поступков человека можно обойтись без гипотезы о существовании "бестелесной субстанции" – души. Человек описывался Гоббсом как материальное, телесное существо, поступки человека можно было вполне объяснить, исходя из его потребностей, а его психические свойства являлись проявлением телесных процессов. Если по Декарту душа человека могла сама порождать мысли и ощущения или даже иметь врожденные знания, то по Гоббсу для этого нужно первичное воздействие внешней среды: "Причиной ощущения является внешнее тело или объект, который давит на соответствующий каждому ощущению орган непосредственно, как это бывает при вкусе и осязании, или опосредствованно, как при зрении, слухе и обонянии. Это давление, продолженное внутрь посредством нервов и других волокон и перепонок тела до мозга" [4, стр. 5].

Следующим вкладом в понимание природы взаимодействия психики и тела стали работы французского естествоиспытателя, философа и врача Жюльена де Ламетри. Свои взгляды на понимание сути психофизиологической проблемы он черпал не только из интроспекции и логического анализа работ других авторов, как это было принято до него, но и из клинической практики. В его книгах впервые в истории мировой мысли прослеживается физиологический подход к пониманию природы психики. В свое время сам Ламетри перенес приступ серьезной болезни, и наблюдение над изменением психики, вызванные высокой температурой, навели его на мысль о тесной связи физиологических и психических явлений, которые он подробно представил в своих последующих публикациях. Уже в первой из них "Естественная история души" Ламетри убедительно доказал, что для объяснения многих психических явлений нет необходимости вводить понятие божественной бестелесной души, а ощущения, испытываемые человеком, возникают в органах чувств, которые передают эту информацию в мозг по нервам.

В следующей своей работе "Человек – машина" Ламетри последовательно и подробно вскрыл механизмы, посредством которых внешние воздействия превращаются в психические явления. Для примера можно привести отрывок из книги, написанной в 1748 г.: "Остановимся подробнее на этих пружинах человеческой машины. Все жизненные, свойственные животным естественные и автоматические движения происходят благодаря их действию. Действительно, тело машинально содрогается, пораженное ужасом при виде неожиданной пропасти; веки опускаются под угрозой удара; зрачок суживается при свете в целях сохранении сетчатой оболочки и расширяется, чтобы лучше видеть, предметы в темноте, ... сердце, артерии и мускулы сокращаются во время сна, как и во время бодрствования; легкие выполняют роль постоянно действующих мехов. И разве не механически происходит сокращение мышц мочевого пузыря, прямой кишки и т.п. или более сильное, чем у других мускулов, сокращении сердца?" [5, стр. 228].

В работах Ламетри прослеживается зародыш того взаимного недоверия между психологами и физиологами, которое в XIX столетии приведет к размежеванию этих наук. Источником познания человека Ламетри считал медицину. Он был убежден, что именно эта наука имеет дело с фактами, из которых может сложиться хорошая теория, в то время как абстрактные рассуждения философов о природе души не могут приблизить нас к пониманию сущности психики. Как справедливо отмечал Ламетри, врачи для разрешения вопроса о природе духовной жизни собирают многочисленные факты, становясь при этом философами, но у профессиональных философов не хватает фактов и опытов, чтобы создать непротиворечивую рабочую гипотезу, объясняющую психику человека. "Человек – машина настолько сложная, – писал Ламетри, – что невозможно сразу составить себе о ней ясное представление; поэтому все теоретические исследования величайших философов, основанные на попытках подвинуться в решении вопроса на крыльях духа, были бесплодны. Можно достигнуть какого-нибудь результата, только практически попытавшись расчленить душу – так, как расчленяются органы тела" [5].

Этого ученого можно назвать первым серьезным исследователем соматопсихических связей, так как в его трудах исключительно подробно описано, какое влияние на психическую деятельность человека оказывает пища, температура, условия жизни и другие факторы. В качестве источника чувств и переживаний Ламетри прямо называет мозг, который он называет "маткой духа" – то есть прямым источником психики [5, стр. 199]. При этом познавательные процессы Ламетри рассматривал как модификации "своеобразного "мозгового экрана", на котором, как от волшебного фонаря, отражаются запечатлевшиеся в глазу предметы" [5, стр. 209], и эта идея очень напоминает современную теорию сознания "глобального рабочего пространства" Бернарда Баарса [6].

Из числа ученых XVIII столетия, которые пытались напрямую связать физиологию с психологией, можно отнести Пьера Жана Жоржа Кабаниса, который утверждал, что мозг рождает мысль, как печень – желчь. Проблема была в том, что такой подход заводил исследователей в тупик, ибо в отличие от желчи, которую можно детально анализировать с помощью химических методов, непосредственно изучать психические явления невозможно из-за их нематериальной природы. В итоге, подобная позиция "вульгарных материалистов" дала повод психологам обвинять всех физиологов в примитивности их попыток понять такое сложное явлением, которым является психика человека. Отсутствие перспектив в понимании природы психики и невозможность обосновать ее происхождение, исходя из существующих на то время физиологических знаний, вынудила выдающегося физиолога Э. Дюбуа-Реймона в ответ на вопрос, сможем ли узнать, как мозг образует психику, произнести свое знаменитое: "Не знаем и никогда не узнаем!" Как физиолог, он не мог сомневаться в том, что психические процессы являются продуктом мозговых процессов, но он не видел возможности понять, как именно они возникают из материальной деятельности мозга. Поэтому тайну возникновения психики он относил к тем "мировым загадкам", которые навсегда останутся неразрешимыми для людей [7]. Интересно, что в конце XX века данная точка зрения стала достаточно популярной среди западных философов, и если Дэвид Чалмерс предполагал, что для решения "трудной проблемы сознания" понадобятся столетия [8], то Колин Макгинн прямо заявлял, что когнитивный аппарат человека изначально неадекватен проблеме объяснения связи между сознанием и мозгом, а соответственно надеяться на решение психофизической проблемы в принципе нереально [9].

К середине XIX столетия в науках о мозге и психике возникло два параллельных течения. Одно из них, представленное психологами, продолжало изучать психические явления методами интроспекции, игнорируя открытия физиологов, полагая, подобно Рене Декарту, что они касаются только низшего "дочеловеческого" этажа психики. Второе течение, к которому принадлежали физиологи и другие естествоиспытатели, наоборот, представляло психические явления лишь отражением мозговых процессов, полагая психику чем-то вторичным и малоинтересным. У этой группы ученых "стало формироваться мнение, что все поведение животных и человека может быть объяснено на основе знаний о материальных процессах деятельности мозга. Но если это так, то зачем тогда вообще нужна какая-то психика, непространственная и нематериальная?" [7].

Настоящим мостом между психологией и физиологией должна была стать книга И.М. Сеченова "Рефлексы головного мозга", но, к сожалению, многие психологи того времени не смогли оценить глубины высказанных в ней мыслей, а цензура напрямую запретила ее, указав, что книга "подрывает религиозные верования и нравственные и политические начала". Тем не менее, в этой работе Сеченову впервые в мире досконально и методично удалось доказать, что многие психические явления в жизни человека вполне можно объяснить в рамках рефлекторной теории, не прибегая к введению понятия нематериальной "души" [10]. До Сеченова физиологов, которые пытались описать активность человека в рамках рефлекторной теории, ставили в тупик два явления. Во-первых, некоторые действия человека носят спонтанный характер, не будучи обусловленными какими-то ни было внешними воздействиями. Как тут не вспомнить декартовскую "божественную душу" и "свободу воли"? С другой стороны, бывает, что явные воздействия на человека не приводят к ответным реакциям – то есть начавшийся рефлекс не находит своего завершения. Ивану Михайловичу удалось логично и красиво обойти данные противоречия. Во-первых, он показал, что якобы спонтанные (произвольные) действия человека могут быть обусловлены сигналами, исходящими изнутри организма человека и поэтому не видимые стороннему наблюдателю. Сеченов назвал их

“темными ощущениями” – и тем самым положил начало исследованию интерорецепции, которые позже продолжил Владимир Николаевич Черниговский и его ученики [11–14].

Во-вторых, в изящном опыте с кристалликом соли, возложенным на мозг лягушки, Сеченов открыл феномен “центрального торможения”, доказав тем самым, что начавшийся рефлекс может быть заторможен. Конечно, нельзя утверждать, что работой “Рефлексы головного мозга” Сеченову удалось полностью объяснить психическую жизнь человека, но эта книга дала надежду естествоиспытателям на то, что с помощью физиологии мы рано или поздно сможем понять, как человеческий мозг генерирует психические явления [15].

В то же время следует отметить, что Сеченов называл психологию “родной сестрой физиологии”, и был глубоко убежден, что именно посредством исследования механизмов мозговой деятельности можно понять закономерности возникновения и развития психических явлений. В статье “Как и кому развивать психологию?” И.М. Сеченов отмечал, что “психическая жизнь – вся целиком или, по крайней мере, некоторые отделы ее – должны быть подчинены столько же непреложным законам, как явления материального мира, потому что только при таком условии возможна действительно научная разработка психических фактов” [10, стр. 119]. Сеченов писал, что если психология будет опираться на физиологию, то только тогда она “приобретет характер положительной науки” – потому что “в основу ее будут положены вместо умствований, нашептываемых обманчивым голосом сознания, положительные факты или такие исходные точки, которые в любое время могут быть проверены опытом” [10, стр. 138]. Иван Петрович Павлов высоко оценил работу своего предшественника, по праву назвав ее “гениальным взмахом русской научной жизни”, так как она давала надежду на то, что со временем психофизиологическая проблема будет все-таки окончательно решена.

Следующий период в истории науки, когда физиология сделала крупный вклад в познание тайны психики, связан с именем И.П. Павлова. Несмотря на то, что Иван Петрович принадлежал к плеяде естествоиспытателей-физиологов, значение его работ для развития психологии трудно переоценить. Он окончательно связал темперамент человека с особенностями работы его мозга, впервые в истории науки смоделировал “экспериментальный невроз”, показал влияние психики человека на работу внутренних органов, разработал объективный метод изучения психических функций на примере условных рефлексов и создал концепцию “двух сигнальных систем”, которая послужила рабочей гипотезой для объяснения природы сознания человека [16, 17]. В настоящее время традиции Павлова по изучению работы мозга плодотворно развиваются в ряде российских научных организациях, носящих его имя [18].

Интересно, что некоторые современные американские психологи, работающие в русле нейро-лингвистического программирования (НЛП), используют методику “ресурсного якорения” для управления психическим состоянием человека, представляя ее как “магический прием”, позволяющий почти мгновенно влиять на психическое состояние человека. Но если мы заменим их слово “якорь” на термин “условный раздражитель”, “ассоциацию” – на “временную связь”, а выражение “эмоциональные ресурсы”, которое используется в НЛП, обозначим как “безусловное подкрепление”, то “магическая” процедура американских психологов превратится в обычную методику выработки условного рефлекса, многократно представленную в работах павловской школы [19, стр. 115]. То, что разработки И.П. Павлова не потеряли своей практической ценности спустя столетие со времени их открытия, лишний раз показывает верность теоретических положений Павлова, лежащих в их основе. По крайней мере, условно-рефлекторный подход хоро-

шо показал себя при лечении фобических расстройств, возникших путем фиксации в подсознании негативного эмоционально значимого события [12, 19, 20].

Но в рамках нашей статьи наиболее интересно мнение И.П. Павлова о взаимоотношениях психологии и физиологии на пути познания принципов психической деятельности мозга. Следует признать, что Иван Петрович достаточно критически относился к стремлениям психологов создавать непроверенные концепции в ущерб сбору фактов и их экспериментальных доказательств. В "программной" статье "Ответ физиолога психологам" он писал: "Физиологу невольно думается, что психолог, так недавно обособившийся от философа, еще не совсем отрешился от пристрастия к философскому приему дедукции, от чисто логической работы, не проверяющей каждый шаг мысли согласием с действительностью. Физиолог действует совершенно обратно. В каждом моменте исследования он старается отдельно и фактически анализировать явление, определяя, сколько возможно, условия его существования, не доверяя одним выводам, одним предположениям" [16, стр. 190]. В то же время Павлов уважал научную деятельность психологов и внимательно изучал их работы. Другое дело, что чисто субъективный и умозрительный подход к психическим явлениям без опоры на физиологические исследования казался ему запутанным и малопродуктивным. В статье "Настоящая физиология головного мозга" Павлов отмечал: "Я вижу и преклоняюсь перед усилиями мысли в работе старых и новейших психологов, но мне вместе с тем представляется, – и едва ли это можно оспаривать, – что работа эта совершается страшно не экономично, и я проникнут убеждением, что чистая физиология головного мозга животных чрезвычайно облегчит, больше того – оплодотворит непомерную, богатырскую работу тех, кто посвящает себя науке о субъективных состояниях человека" [17, стр. 202].

Следует отметить, что психологи начала XX столетия высоко ценили работы Павлова и считали честью слушать его доклады на психологических конференциях мирового уровня. К сожалению, ныне престиж физиологических изысканий в глазах современных психологов значительно снизился. Так, известный российский психолог В.П. Зинченко в статье "Ответ психолога физиологам" попытки физиологов выявить материальный субстрат психики называет "обманчивыми обещаниями физиологической психологии и нейронауки объяснить все явления душевной и сознательной жизни" [21, стр. 72]. Этот автор считал единственно правильным для психологов, которых интересует физиологические механизмы психической деятельности, "изучать физиологические процессы как сопутствующие психическим, а не вместо них" [21, стр. 81] – то есть речь идет о возврате к психофизиологическому параллелизму, когда работа мозга и психические процессы функционируют по отдельности, по своим законам. Но тогда логическим продолжением таких взглядов станет сомнение в положении о том, что "мозг – это орган, рождающий психику" – что отбросит науку на две тысячи лет назад, во времена Аристотеля.

Если же мы все-таки принимаем за основу многократно доказанный наукой факт первичного положения мозга по отношению к психике и сознанию человека, то перед нами встает задача понять, как вполне объективная работа мозга превращается в субъективные и нематериальные психические явления. Задача на данном уровне развития науки кажется весьма сложной, но мы, как ученые, обязаны ее поставить, чтобы лучше понять себя, людей, обладающих сознанием. Если же мы берем за основу тезис психологов, что "физиологические процессы лишь сопутствуют психическим, но не являются их причиной" [21] – тогда тайна нашего сознания останется тайной навеки, ибо путь познания через описание психических явлений, вместо их объяснения не дает даже теоретической возможности понять суть высшего продукта эволюции известной нам Вселенной, которым является сознание человека. В итоге, несмотря на явный прогресс нейробиологии, среди ученых, изучающих мозг и психику, нет полного согласия, "является ли сознание специфиче-

ской материальной по своей основе функцией мозга, или обособленным нематериальным процессом, воплощением духа или души" [22, стр. 174].

Вернемся, однако, к историческому обзору попыток психологов и физиологов понять принципы работы психики. В ряду выдающихся российских физиологов Сеченова и Павлова нельзя не упомянуть основателя рефлексологии Владимира Михайловича Бехтерева. Этот выдающийся ученый писал: "Нет ни одного психического процесса, который бы являлся только субъективным или духовным в философском значении этого слова и не сопровождался бы определенными материальными процессами. Мы вправе и должны говорить ныне не о душевных или психических процессах в настоящем смысле слова, а о процессах нервно-психических, и везде, где мы имеем дело с психикой, нужно иметь в виду собственно нервно-психические процессы, иначе – невропсихику" [23, стр. 15].

ПОПЫТКИ РЕШЕНИЯ ПСИХОФИЗИЧЕСКОЙ ПРОБЛЕМЫ В XX ВЕКЕ

С начала XX столетия психология представляла собой (да и сейчас представляет) набор различных научных школ и течений, по-разному описывающих и объясняющих психические явления. Психоанализ, гештальтпсихология, бихевиоризм, телесно-ориентированная психология, нейролингвистическое программирование и другие направления этой науки представляют свои гипотезы и концепции работы человеческого мозга и психики. Оттолкнувшиеся от работ Павлова такие бихевиористы как Б.Ф. Скиннер, Джон Уотсон вообще отказались от изучения субъективного мира животных и человека, сосредоточившись на объективной регистрации поведения живых существ [24, стр. 357–397]. Основным методом бихевиоризма является создание экспериментальных ситуаций, фиксация реакций на воздействие и наблюдение. С точки зрения бихевиористов, психика – это абстракция, которую невозможно изучать научными методами. Бихевиористы использовали механизм условных рефлексов для объяснения сложных поведенческих актов и сосредоточили свое внимание на изучении так называемых "условных рефлексах второго рода". Инструментальные рефлексы интересны тем, что они являются переходным этапом от рассудочной деятельности животных к осознанной деятельности человека. Не умаляя заслуг этого направления, все же следует признать, что отказ от изучения собственно психических процессов и субъективных ощущений не позволил бихевиористам далеко продвинутся в плане решения психофизической проблемы. Здесь мы снова приходим к выводу, что любой односторонний подход к изучению психики (физиологический или психологический) обречен оказывается малопродуктивным.

В противоположность бихевиористам Зигмунд Фрейд и другие приверженцы психоаналитического подхода, сфокусировались на глубинных и весьма субъективных переживаниях человека, исходящих из примитивной части человеческой психики – так называемого "Бессознательного". Для объяснений психических явлений они создали ряд умозрительных конструкций, к которым так скептически относился И.П. Павлов. Примером таких концепций являются выдвинутые К.Г. Юнгом понятия "коллективного бессознательного", "архетипа", "анимуса", "самости" и т.д., которые невозможно ни подтвердить, ни опровергнуть экспериментальным путем – в них можно только верить [24, стр. 78–79, 114]. Согласно Фрейду, психика состоит из трех компонентов: огромного древнего и темного Бессознательного, в котором господствуют первичные потребности и инстинкты, и которое никогда не будет до конца познано человеком ("Оно"), из осознаваемого и рационального компонента ("Эго") и социального цензора ("Супер Эго") [24, стр. 44–45]. Следует отметить, что Фрейд начинал свой путь в науку как невролог и начинал изучать работу мозга вполне объективными методами, но впо-

следствии перешел в лагерь психологов, которые обладают эксклюзивным правом не брать на себя обязательств по экспериментальному подтверждению своих гипотетических конструкций. В этой связи интересно вспомнить высказывание Павлова о Фрейде, которое приводит в своих воспоминаниях его ученик Ю.П. Фролов: “Когда я думаю сейчас о Фрейде и о себе, мне представляются две партии горнорабочих, которые начали копать железнодорожный туннель в подошве большой горы – человеческой психики. Разница состоит, однако, в том, что Фрейд взял немного вниз и зарылся в дебрях бессознательного, а мы добрались уже до света. А Фрейд может только с большим или меньшим блеском и интуицией гадать о внутренних состояниях человека. Он может, пожалуй, сам стать основателем новой религии”.

После кончины И.П. Павлова его взвешенное и уважительное отношение к психологии как науке было пересмотрено, и советская психология подверглась гонениям – было даже предложение полностью заменить ее учением о высшей нервной деятельности (ВНД). Инициированная Сталиным совместная сессия Академии наук и Академии медицинских наук СССР 1950 г. нанесла удар не только по психологии, но и по ряду выдающихся физиологов (Л.А. Орбели, И.С. Бериташвили, Н.А. Бернштейн и др.), которые вносили существенный вклад в интеграцию этих наук.

Следует отметить, что помимо чисто методических моментов, для разгадки феномена психики важна и стратегия поиска истины. Если мы обратимся к отечественным ученым, то увидим, что они по-разному отвечали на вопрос, являются ли знания о работе физиологических процессов в мозге достаточным основанием для понимания психических процессов. Павлов полагал, что одной физиологии достаточно для понимания всех закономерностей психики и никакой другой теории для этого не нужно. Бехтерев считал, что физиология и психология должны взаимно дополнять друг друга, и для того, чтобы понимать работу человеческого сознания, необходимо использовать обе науки. Третий взгляд на данную проблему высказывал П.К. Анохин. Он считал, что психология и физиология – два взаимно несовместимых предмета, имеющих собственную проблематику и собственный категориальный аппарат. Четвертый подход характерен для большинства психологов, и заключается в том, что научным познанием психики должны заниматься исключительно психологи, а физиологи в принципе не могут претендовать на понимание природы человеческого сознания [21, 25]. В настоящее время среди физиологов постепенно формируется понимание того, что не разобщение двух наук, а их деликатная интеграция может стать ключом к пониманию механизмов мозга. Так, Наталья Петровна Бехтерева в одной из своих работ писала: “При изучении механизмов психических явлений человека адекватным оказывалось сочетание классических приемов павловской физиологии и возможностей “старой”, прошедшей долгий путь развития, психологии с новейшими, наиболее современными возможностями нейрофизиологии” [26, стр. 110].

Во второй половине XX столетия вновь наметилось тесное соприкосновение психологии и нейрофизиологии, причем, это было связано с развитием микроэлектродной техники, позволившим ученым заглянуть в глубинные механизмы жизнедеятельности мозга. Речь идет об опытах Джеймса Олдса и Питера Милнера, обнаруживших так называемый “Центр удовольствия”. Впоследствии некоторые исследователи пришли к выводу, что Олдс и Миллер в своих экспериментах обнаружили не “центр удовольствия”, а “центр мотивации” или “центр подкрепления”, который стимулировал животное раз за разом совершать однотипные двигательные реакции, подобно алкоголику или наркоману, совершающему компульсивные действия [27].

Следует отметить, что Дж. Олдс первоначально изучал процессы мотивации в качестве социального психолога, но затем заинтересовался мозговыми механизмами этого процесса и, в конце концов, обнаружил участок мозга, раздражение которого превосходило удовольствие от таких значимых стимулов, как еда, вода или особи противоположного пола. П. Милнер, наоборот, начинал как инженер, что помогло ему в устройстве прибора для самораздражения подопытных животных. Эти два физиолога замахнулись на "святая святых" психологии – на эмоции и мотивацию, и им удалось доказать, что для объяснения механизмов этих явно психических явлений не требуется привлечения концепции "души", и достаточно лишь правильно организованного эксперимента. Итогом многолетней работы Питера Миллера стал его базовый учебник "Физиологическая психология", который явился мостом между двумя науками, изучающими мозг. Эти эксперименты внесли существенный вклад в дело решения психофизической проблемы, так как впервые чисто физическое воздействие электрическим током на мозговые структуры можно было превращать во вполне определенные психические феномены – мотивацию и эмоции. Дальнейшие работы по изучению работы мозга показали, что грамотно продуманная и реализованная методика оказывается весьма плодотворным инструментом и во время психологического эксперимента, что доказал Роджер Сперри, отрывший межполушарную ассиметрию мозга и получивший за эти работы Нобелевскую премию.

После обнаружения возможности вызывать у животных и человека определенные эмоциональные реакции путем прямого воздействия на мозг у части физиологов сформировалась надежда, что понимание связи мозговой и психической деятельности уже близко. Известный американский нейрофизиолог Хосе Дельгадо на основании своих многочисленных исследований писал: "Возможность вмешиваться в психические функции путем непосредственного воздействия на различные отделы мозга – несомненно, новое явление в истории человечества, и наши цели сегодня заключаются не только в том, чтобы расширить понимание нейрофизиологических механизмов сознания, но и в том, чтобы научиться воздействовать на эти механизмы физическими методами" [28, стр. 72].

Еще одну надежду на скорое разрешение психофизиологической проблемы дали работы Д. Хьюбела и Т. Визеля, посвященные механизмам деятельности зрительного анализатора [29]. Усилиями физиологов был тщательно прослежен весь путь от источника света до зрительной коры сначала у лягушки, потом у крысы и человека. Было изучено, как рецепторы сетчатки превращают фотоны света в электрические сигналы, как ганглиозные клетки передают эту информацию в мозг, как верхние бугры четверохолмия регулируют световой поток в зависимости от дистанции до объекта и его освещенности, как латеральные коленчатые тела таламуса отфильтровывают лишнюю информацию и как нейроны зрительной коры анализируют поступившие сигналы и распознают их. Но, даже изучив все элементы зрительной сенсорной системы, ученые не смогли ответить на вопрос, на какой стадии физиологические процессы превращаются в психические, и каким образом электрические процессы, протекающие в нейронных сетях мозга, превращаются в ощущение света. Психофизиолог Н.И. Чурикова писала по этому поводу: "Для идеалиста здесь, может быть, и нет большой проблемы. Для него психика – это продукт особой духовной субстанции, а не функция мозга, и чем меньше она находит свое место в ряду материальных явлений, тем лучше. А для материалиста это трудная и мучительная проблема, которую до сих пор не удавалось удовлетворительно разрешить. Ощущение при детальном детерминистическом анализе нервных событий, разыгравшихся между раздражителем и ответной реакцией ... оказывается только сопутствующим явлением, эпифеноменом, неизвестно как, почему и зачем возникающим и существующим" [30, стр. 18].

Тем не менее, убеждение в том, что раскрытие тайны психики произойдет при активном участии физиологов, основано на сравнении достижений в сфере нейрофизиологии, с одной стороны, и "чистой" психологи – с другой. За последний век со стороны психологии мы видим лишь десятки разнообразных концепций психики, конкурирующих между собой, а в багаже нейрофизиологии – сотни открытых закономерностей работы мозга, связанных с теми или иными психическими явлениями. В частности, была выдвинута и нашла подтверждение гипотеза о том, что "для обеспечения деятельности мозга складывается неоднородная блочная система, имеющая активирующиеся элементы, но большая часть которой является скрытой. Элементы этой системы являются относительно независимыми "процессорами" (гибкими звеньями), модулирующими работу целостной системы" [31, стр. 113]. Как отмечает Алексей Михайлович Иваницкий, "Происхождение и функциональный смысл субъективных переживаний – одна из загадок нашего мозга.... Опыт веков показывает, что эти вопросы не могут быть решены путем чистой дедукции и философских построений. Путь к разгадке изучения работы мозга объективными методами и, прежде всего, анализ того, как возникают субъективные переживания, каков их мозговой механизм" [32, стр. 241].

Для примера возьмем понятие "Бессознательного" Фрейда, которое считается одним из главных открытий XX века в психологии. За столетие с момента его возникновения психологи практически не продвинулись на пути к пониманию истинной природы этого явления. Пока есть только масса гипотез, ни одна из которых не может претендовать на научность и доказательность, хотя они пользуются популярностью у определенного числа психологов. И за это же время в физиологии были обнаружено огромное число явлений и процессов, которые можно с большим основанием считать материальным субстратом бессознательных явлений. Согласно концепции Фрейда, бессознательное работает по "принципу удовольствия" – но обнаружили этот центр в ядрах гипоталамуса именно физиологи – Олдс и Миллер. Способом обработки информации Бессознательным является интуиция. А роль интуитивного восприятия мира и роль в нем межполушарной ассиметрии были показаны в работах нейробиолога Роджера Сперри. Многие бессознательные психические явления имеют своим источником сигналы из внутренних органов, а нарушения работы психики проявляются в форме психосоматических заболеваний. Это явление давно известно из практики психологов, но детали данного процесса, механизм работы интерорецепторов, а также кортико-висцеральные связи были подробно изучены отечественными физиологами – К.М. Быковым, В.Н. Черниговским и их учениками [11, 14, 33]. Эти работы показали, что вегетативная (автономная) нервная система обеспечивает поддержание гомеостазиса и возможность оптимального взаимодействия с окружающей средой [11], что является базисом психологического благополучия человека, а при сбое кортико-висцеральных отношений возникают различные психосоматические заболевания. Кроме того, частично осознаваемая информация от внутренних органов, которую Сеченов назвал "темными ощущениями", оказывает огромное влияние на психику человека, воздействуя на ту часть его психики, которую Фрейд обозначил как "Бессознательное". Недаром метасимпатическую нервную систему и еще полимодальную интероцептивную сенсорную систему внутренней жизни и процессов организма, играющих главную роль в поддержании гомеостазиса, иногда называют "малым мозгом" человека, потому что сбой в ее работе зачастую оказывает существенное влияние на психическое состояние человека [11, 13]. Список внушительного вклада физиологов в решение психофизиологической проблемы можно было бы продолжать, но и так видно, что именно представители этой науки ищут и находят материальные субстраты психических явлений, о которых психологи в большей мере только размышляют. Более того, физиологи уже не боятся затраги-

вать такие “чисто психологические” понятия как эмоции, интеллект и даже любовь, вскрывая при этом нейрофизиологические механизмы данных явлений, как это сделал недавно С.В. Медведев в книге “Мозг против мозга” [34].

За последнее время усилиями физиологов и нейробиологов было собрано большое количество информации о механизмах мозговой деятельности. В частности, помимо относительно простых нейронов-детекторов, избирательно реагирующих на определенные характеристики стимула, обнаружены нейроциты, осуществляющие более сложные познавательные функции. Это так называемые “гностические нейроны”, нейроны цели, нейроны места и т.д. [35, 36]. В гиппокампе выявлены клетки новизны, активирующиеся при действии новых стимулов и нейроны тождества, опознающие знакомые (многократно повторяющиеся) стимулы. Что касается внутренней среды организма, то имеются нейронные системы, репрезентирующие состояния голода и жажды, удовольствия и страдания, системы, связанные с осуществлением полового, материнского, территориального поведения. Таким образом, можно заключить, что в мозге высших животных и человека складывается своего рода огромная карта, репрезентирующая их внешнюю и внутреннюю среду и разнообразные результаты их взаимодействий с миром [7].

Исключительно интересную и серьезно обоснованную с точки зрения физиологии гипотезу работы сознания человека предложил А.М. Иваницкий [32, 37]. По его мнению, психика возникает на основе синтеза нервной системой трех видов информации: “исходящей из внешней среды, извлекаемой из памяти и приходящей из центров мотивации. Первая определяет связь сознания с внешним миром, вторая связывает настоящее и прошлое, включая личный опыт субъекта. Третья связывает реальную ситуацию с удовлетворением определенной потребности, что придает сознанию жизненный смысл” [37, стр. 89]. Другой подход к решению проблемы формирования сознания предложил психофизиолог Е.Н. Соколов. Согласно его мнению, сознание возникает в специфических нейронах сознания, образующих иерархические пирамиды. При этом предполагается, что внутриклеточные механизмы сознания основаны на квантовых процессах в микротрубочках цитоскелета нейронов сознания [36].

Еще один подход к пониманию психики делает акцент на информационную составляющую работы мозга, а так как информация, так же, как и психика, лишена атрибутов материальности, то это дает надежду на решение психофизической проблемы. При таком подходе психика представляет из себя не продукт деятельности мозга, а естественный режим его работы во время обработки поступающей информации и создания виртуальных копий объектов реального мира. Формируя психические явления, мозг не просто “отражает” мир, но и смотрится в это отражение, используя его для реализации своих потребностей, в том числе – высшего порядка [38].

Впервые информационный подход к работе мозга был предложен в работах У. Маккалока и У. Питтса в 1943 г., создавших концепцию, согласно которой нейрон определялся как “элементарная функциональная единица мозга, служащая для обработки информации” [39, стр. 181], что удачно сочеталось с теорией информации Клода Шеннона, созданной примерно в то же время. Таким образом, появилось первое понимание, что чисто физическое явление – нервный импульс, может стать источником новой информации, а при условии ее биологической значимости впоследствии превратиться в некое психическое явление. В наше время, в связи с широким распространением компьютеров, данный подход становится все более понятным. Например, с точки зрения С.В. Медведева, мозг представляет собой своеобразный интерфейс между идеальным и материальным, способный преобразовывать одно в другое, а не так давно было установлено, что часть нейронных ансамблей подключается к общей работе практически не меняя своего энергопо-

требления, выполняя роль дополнительных “процессоров”, повышающих возможность мозга при решении сложных задач [31, стр. 113].

СОВРЕМЕННЫЙ ЗАПАДНЫЙ ПОДХОД К ВЗАИМООТНОШЕНИЮ ПСИХИКИ И МОЗГА

В англоязычной литературе психофизическую проблему обозначают как “mind-body problem”, и в основном она была ареной столкновения различных философских школ, причем из фокуса их внимания часто были исключены механизмы мозговой деятельности, а споры в основном велись по поводу феноменологии – то есть осознания человеком своего чувственного опыта. Так как темой данного обзора является взаимоотношения физиологии и психологии в процессе изучения работы мозга, мы не будем здесь подробно останавливаться на многочисленных философских течениях, предлагающих свои концепции психофизического взаимодействия, и упомянем только Дэвида Чалмерса, который ввел термин “трудная проблема сознания”, полагая, что понять природу сознания на основе материалистического подхода невозможно в принципе [8]. Данный подход является весьма удобным для философов, так как позволяет им развивать различные спекулятивные концепции, которые невозможно ни подтвердить, ни опровергнуть, однако неприемлем для нейрофизиологов, миссией которых является познание механизмов работы мозга.

Среди нейробиологических концепций сознания заслуживают внимания работы первооткрывателя структуры ДНК Френсиса Крика, который предложил так называемую “прожекторную теорию сознания”. Согласно его взглядам, материальной основой сознаний являются динамические таламо-кортикальные связи, обеспечивающие непрерывный обмен информации между дорзальными ядрами таламуса и определенными участками коры больших полушарий. Новым в его концепции было открытие не только таламо-кортикальных, но и кортико-таламических влияний, обеспечивающих непрерывную реверберацию нервных импульсов, что, по мнению Ф. Крика, обеспечивает процессы кратковременной памяти и сознания [40]. И хотя эти взгляды были основаны на изучении только зрительного анализатора, сам Крик предполагал, что данный механизм является общим для обработки и осознания всех ощущений. Тем не менее, он понимал, что “трудная проблема сознания” вряд ли может быть решена на основании такого относительно простого механизма, и шутливо замечал, что “в целом трудно поверить, что наша яркая картина мира действительно полностью зависит от активности нейронов, которые так шумны и их так трудно наблюдать” [40, стр. 246]. Из работ отечественных исследователей к концепции Ф. Крика ближе всего концепция “информационного синтеза” А.М. Иваницкого, но последняя представляет более системную модель, включающую в себя помимо таламо-кортикальных связей непрерывный обмен информацией между центрами памяти и мотивации [32, 37].

В рамках рассмотрения взаимоотношений нейрофизиологов и психологов/философов, изучающих проблему сознания, также имеет смысл остановиться на эволюции взглядов Кристофа Коха, который начинал работать с Ф. Криком как нейробиолог, а затем стал сторонником скорее философских, нежели физиологических взглядов на проблему сознания. В частности, в своих интервью он неоднократно подчеркивает мысль о том, что “феноменальное происходит из иного царства, нежели физическое, и подчиняется иным законам”, а значит, что психика не может быть понята в результате физиологических экспериментов материального характера. В последней книге “The Feeling of Life Itself” К. Кох обосновывает гипотезу “панпсихизма”, предлагая подход к сознанию как любому субъективному переживанию, от

самого приземленного до самого возвышенного – по мнению Коха, это "ощущения бытия жизни", что совпадает с названием книги [41].

В одном из интервью Кристофер Кох так определил свое понимание панпсихизма: "Учитывая отсутствие четкого и убедительного Рубикона, отделяющего простых животных от сложных, а простых – от сложных форм поведения, вера в то, что только люди способны испытывать что-либо сознательно, кажется абсурдной. Гораздо более разумным предположением является то, что до тех пор, пока не доказано обратное, многие, если не все многоклеточные организмы испытывают боль и удовольствие и могут видеть и слышать образы и звуки жизни... Даже у червя есть, пожалуй, самое смутное ощущение жизни ("*Even a worm has perhaps the vaguest sense of being alive*") [42].

Здесь следует уточнить одно важное терминологическое обстоятельство, без учета которого трудно сопоставлять отечественные и зарубежные концепции, касающиеся психофизической проблемы. В отечественной психологии есть четкое разделение понятий "Психика" и "Сознание", и если считается, что психика есть у всех животных, обладающих нервной системой, то сознанием обладают только люди, так как сознание неразрывно связано с речью, абстрактным мышлением и развитой социализацией. В западной же литературе при попытках решения психофизической проблемы гораздо чаще используют термин "Consciousness", или "Mind", а не "Psyche", таким образом, речь чаще идет о психических явлениях именно человека, а значит – с обязательным феноменологическим компонентом осознания своих ощущений, мыслей и чувств. Получается, что не поняв принципы генерации психических явлений относительно простой нервной системой животных, западные исследователи пытаются сразу понять несравнимо более сложную человеческую психику, в которой на природные компоненты бессознательного наслаиваются социо-культурные компоненты тысячелетней истории всего человечества. Поэтому, если отечественный физиолог, знающий о наличии хемо- и механорецепторов дождевого червя, вполне может согласиться с наличием у червяка простейших психических ощущений, возникающих в нервной системе, то высказывание Коха об осознании червяком "чувства жизни" и какой-то осознанности его бытия кажется слишком смелым и необоснованным.

В своих последних работах Кох опирается на "теорию интегрированной информации" Джулио Тонони [43, 44], которая при своем возникновении обещала новаторский подход к пониманию природы сознания, но, судя по всему, не оправдала возложенных на нее надежд. В этой теории много априорных постулатов и математики, но очень мало конкретики, касающейся мозговых структур, участвующих в формировании сознания. Например, согласно воззрениям Дж. Тонони, интегрированная информация есть информация, "генерированная системой сверх и помимо той информации, которая генерирована ее частями независимо друг от друга", а система, демонстрирующая сознание, должна обладать двумя основными свойствами: информационностью и интегрированностью - но что дают нам эти положения в плане понимания того, как мозг превращает внешний чувственный опыт в психические явления? Другими словами, в нынешнем ее виде, теория Тонони всего лишь весьма схематичная модель, описывающая отдельные аспекты мозговой деятельности, но не раскрывающая ни природы человеческого сознания, ни способов его реализации мозговыми структурами.

В настоящее время, помимо упомянутых выше теорий сознания, существует более десяти других концепций, каждая из которых позволяет объяснить лишь часть феноменов, присущих сознанию, но не одна из них не является целостной и всеобъемлющей. В качестве примера можно упомянуть теорию глобального рабочего пространства Бернарда Баарса, которая постулирует то, что сознание - это высшая психическая функция, которая необходима, чтобы интегрировать различные ко-

гнитивные психические процессы в единое целое. Данная концепция включает в себя элементы рабочей памяти, внутреннюю речь и визуальные образы, и часто объясняется в виде "театральной метафоры", где в "театре сознания" "прожектор избирательного внимания" освещает яркое пятно на сцене [6]. Еще одна концепция сознания – "само-модель теории субъективности" ("Self-model theory of subjectivity") Метцингера представляет собой интеграцию философских концепций и современных нейробиологических представлений о мозге. Сущность данной концепции заключается в том, что в процессе эволюции у высших животных возникает способность трансформировать окружающий мир и самих себя в виде субъективных моделей как окружающего мира, так и самих себя ("phenomenal self-models" или PSMs.). После создания таких моделей организм воспринимает их как реальность, не воспринимая их как созданные мозгом модели. По замыслу автора данной концепции именно так возникает сознание и самосознание [45].

Следует отметить, что концепция виртуальной модели мира как основа сознания становится все более популярной как у западных исследователей, так и отечественных. Дело в том, что данный подход позволяет перекинуть мостик между материальным нейрокомпьютером (мозгом) и информационной моделью, которую тот создает для лучшей адаптации к окружающей среде. Другое дело, что при этом возникает ситуация, хорошо знакомая практическим психологам: иногда человек начинает действовать вопреки объективной реальности, но ориентируясь на ту модель мира, которую создал его мозг, как бы далека от реальной жизни она ни была [38]. Как писал по этому поводу Крис Фит "Наше восприятие на самом деле начинается изнутри – с априорного убеждения, которое представляет модель мира, где объекты занимают определенное положение пространства" [39, стр. 197] – и добавим от себя – *"..и где они имеют свой субъективный уровень значимости, необъяснимый для постороннего наблюдателя, как это бывает в случае сильной любви, религиозных или идеологических предпочтений*" (Прим. авт.).

Следует отметить, что число современных гипотез сознания насчитывает два–три десятка, причем диапазон привлекаемых знаний из смежных областей наук достаточно широк – от философских, теологических и мистических конструкций до квантовой физики ("квантовая теория сознания"). Но реальный (пусть и медленный) прогресс пока наблюдается только в сфере нейрофизиологии, где с помощью объективных методов ученые осторожно, но неуклонно познают отдельные элементы сознания человека в связи с конкретными мозговыми структурами или гормональными механизмами. При этом нейробиологи уже заглядывают в такие сокровенные и интимные сферы психики как романтическая любовь. Так, при предъявлении испытуемым фотографий объектов их любви во время сканирования мозга мФРТ, была показана специфическая активность в определенных областях мозга, отвечающих именно за это чувство [46]. В другой работе были обнаружены мозговые структуры, ответственные за эмпатию человека и способность переживать боль, которую испытывает близкий человек. Оказалось, что эти структуры лишь частично совпадают с теми мозговыми центрами, которые активируются при нанесении болевого стимула данному человеку, но по совокупности отличались от тех структур, которые включались при нанесении боли другому [47]. Таким образом, даже эти две работы показывают такие тонкие и деликатные зоны мозга, которые отвечают за любовь и сострадание, уже начинают раскрывать свои тайны исследователям, в то время как философы и поэты веками лишь размышляли о них.

ПЕРСПЕКТИВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ И ПСИХОЛОГИИ В ДЕЛЕ РЕШЕНИЯ ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЛЕМЫ

Следует отметить, что нередко нейрофизиологи и психологи, фактически решая одну глобальную задачу, стараются как бы "не замечать" друг друга. Физиологи изучают мозг, стараясь не задумываться о психике и сознании, так как не знают, как подступиться к "нематериальным" явлениям. В то же время психологи и философы ограничиваются изучением только психических явлений, так как в большинстве своем плохо представляют устройство и принципы работы мозга, а абстрактные рассуждения удобней и безопасней, чем эксперименты, которые, увы, нередко дают неопределенный или "отрицательный" результат. Тем не менее, в последнее время появляются и становятся традиционными междисциплинарные конференции, в которых происходит плодотворный обмен фактов и мнений между психофизиологами, нейробиологами, нейропсихологами, психиатрами, биохимиками, генетиками и т.д. Примером таких международных симпозиумов является конференция по нейронаукам и биологической психиатрии "Stress and behavior" [48].

Более того, в последнее время наблюдается взаимопроникновение нейрофизиологии и психологии друг в друга. Как отмечают некоторые исследователи, "нарастающая тяга наук друг к другу привела к тому, что внутри каждой из них образовалась область, далеко заходящая на территорию другой: со стороны психологии это психофизиология (или, говоря шире, физиологическая психология, включающая также и нейропсихологию), а со стороны физиологии – это физиология высшей нервной деятельности (которая по кругу вопросов приблизительно соответствует тому, что за рубежом называют психобиологией, биологической психологией или поведенческой нейронаукой)" [49, стр. 63].

Таким образом, подводя итог обзору многолетним попыткам физиологов понять принципы работы мозга в плане генерации им психических явлений, можно сказать, что несмотря на выдающиеся открытия в области физиологии мозга, нейрофизиологам в одиночку, без кооперации с представителями других наук будет трудно понять такое многокомпонентное и совершенное явление, как сознание. По мере получения все новых данных о работе мозга, желательно не только сопоставлять их с данными, полученными в психологических исследованиях, но и заранее планировать эксперименты так, чтобы в них принимали участие как физиологи, так и психологи. Но при этом возникает проблема, которую потребуется решить – это преодоление различий в терминах данных наук, их трактовка, а также общее понимание того, что мы изучаем, и как это интерпретируем. Как отмечал в своей работе Е.Н. Соколов, "желательно наметить пути сближения языка психологии и языка нейронауки, интегрировавшей комплекс наук, которые заняты исследованием работы мозга. Возможность такого сближения основана на том, что и психология, и нейронаука изучают отражательную функцию мозга" [35, стр. 87]. Получается, что для объединения усилий исследований психологами и физиологами придется разработать новую систему терминов, объединяющую терминологию, понятную ученым этих двух наук. Пока же физиологические понятия (нейроны, нервные импульсы, возбуждение, торможение и т.д.) очень слабо сопрягаются с психологическими терминами (восприятие, мысли, чувства, воображение и т.д.). В настоящее время попыткой сопряжения двух видов терминологии занимается псхофизиология, но представители этого направления выбирают либо физиологический, либо психологический вариант своего языка, на котором они проводят свои исследования.

Второй, более радикальный вариант решения психофизиологической проблемы заключается в коренной перестройке наших понятий о мозге и психике, и отказе от существующих способах описания работы мозга. Так, в свое время Нобелевский

лауреат Ф. Крик писал, что если мы не в состоянии в научном материалистическом ключе решить вопрос соотношения психики и деятельности мозга, то это наводит на мысль, "что весь наш способ мышления о таких проблемах, возможно, ошибочен" [50, стр. 258].

Еще одна важная тема, дающая нам надежду на решение психофизиологической проблемы – это совершенствование методических приемов, используемых для ее решения. Как метко сказал Павлов, "наука движется толчками в зависимости от успехов, делаемых методикой", и эту мысль можно проследить на всех этапах научного познания мозга. После первого открытия "животного электричества" Луиджи Гальвани в конце XVIII столетия ученые получили первый ключ к пониманию механизмов работы мышечной и нервной системы. Дальнейшие исследования Карла Маттеучи и Э. Дюбуа-Реймона доказали, что электрические процессы являются основой нервной деятельности, а открытие Ричардом Кэтоном и В.Я. Данилевским биотоков мозга позволили (хоть и косвенно) наблюдать работу мозга во время различных психических состояний. Открытие сначала струнного гальванометра, а затем более мощных электронных усилителей и осциллографа позволили физиологам напрямую увидеть электрические процессы, протекающие в мозге. В последние годы, помимо электрофизиологических методов, на помощь ученым, изучающим мозг, пришли такие мощные методы, как позитронно-эмиссионная томография, функциональный магнитный резонанс и многоканальная запись электрических и магнитных полей мозга. Как пишет А.М. Иваницкий, "новейшие приборы позволили увидеть на экране дисплея, какие зоны активизируются при выполнении различных задач, требующих умственного напряжения, а также с большой точностью определять локализацию поражения при заболеваниях нервной системы. Ученые обрели возможность получать соответствующие изображения в виде красочных карт мозга" [37, стр. 85].

Если мы сравним успехи нейрофизиологии и психологии в изучении механизмов мозговой деятельности за последнее столетие, то они будут несравнимыми по глубине и значимости. Тем не менее, одним физиологам вряд ли удастся напрямую решить психофизиологическую проблему без помощи психологов – уж слишком специфическими являются психические процессы, которые выходят за рамки процессов, которые традиционно изучали физиологи. Помимо двух основных наук, пытающихся разрешить психофизиологическую проблему, этим делом занимаются и представители смежных областей, которые стоит здесь перечислить. Это психофизиология, нейропсихология, нейрофармакология, психиатрия и информатика (особенно в тех ее разделах, которые занимаются моделированием нейронных сетей и искусственного интеллекта). Если брать отдельные разделы психологии, то наиболее перспективными нам кажутся когнитивная психология и нейро-лингвистическое программирование [19]. Последнее направление интересно тем, что рассматривает мозг человека как своеобразный нейрокомпьютер, создающий виртуальную модель мира и выстраивающий взаимодействие человека с внешней средой на основе данной модели. Такая концепция позволяет максимально близко подойти к разгадке психофизиологической проблемы, так как снимает изначальное противоречие между материальным мозгом и нематериальной психикой. Ведь совокупность информационных процессов в мозге, создающего виртуальный аналог окружающего мира, уже нематериальна сама по себе, а значит, является мостиком между физическими процессами в нейронных сетях и виртуальными психическими явлениями человека [38]. Интересно, что Н.П. Бехтерева, описывая в одной из своих работ процесс восприятия и распознавания речи, за несколько десятилетий предвосхитила современный подход к мозгу, как нейрокомпьютеру, когда писала, что для решения психофизической проблемы необходимо "изучение того, как физически осуществляется в мозгу кодирование и декодирование словесных сигна-

лов, формирование того базиса, без которого невозможно осуществление собственно мыслительных процессов", и подчеркивала, что "процесс кодирования словесных сигналов осуществляется с помощью биоэлектрических процессов" [26; стр. 118].

По сути, и мозг человека и компьютер (например, управляющий авиалайнером в режиме автопилота) весьма близки между собой по своему предназначению. И тот, и другой предназначены для сбора информации, ее обработки и принятия решений, направленных на оптимальные действия в меняющихся условиях среды. В обоих случаях происходит сбор первичной информации, трансформация ее в электрические сигналы и передачу их в центральный процессор, который путем ее анализа и сопоставления с памятью находит оптимальное решение, реализующееся посредством рабочих органов. Отличие состоит в том, что, во-первых, человек в отличие от компьютера осознает часть этих процессов, а, во-вторых, то, что его действия определяются не одной программой, а целым комплексом биологических и социальных программ, обуславливающих большую вариабельность действий человека, что ошибочно приписывается так называемой "свободе воли". Как писал Иваницкий, "Сознание человека – есть, по существу, его жизнь, состоящая из бесконечной смены впечатлений, мыслей и воспоминаний. Загадка нашего мозга многопланова и затрагивает интересы многих наук, исследующих тайны бытия. Один из главных вопросов – как сознание связано с мозгом. Данная проблема находится на стыке естественно-научного и гуманитарного знания, поскольку сознание возникает на основе происходящих в мозге процессов, но его содержание в значительной мере определяется социальным опытом" [37, стр. 85].

В начале XXI века познание принципов работы мозга вошло в число основных приоритетов мировой науки. Ведущие государства мира начали крупные национальные и международные программы в области нейронаук. Это масштабная программа США "The BRAIN Initiative: Building, Strengthening, and Sustaining"; европейская программа "The Human Brain Project: Creating a European Research Infrastructure to Decode the Human Brain"; китайский проект "China Brain Project: Basic Neuroscience, Brain Diseases and Brain-Inspired Computing"; похожие программы Канады, Японии и Южной Кореи [51]. В нашей стране создание подобной программы "Нейронауки и здоровье нации" декларировано Постановлением Президиума РАН в 2019 г. Можно сказать, что человечество наконец-то решилось понять, как оно мыслит и чувствует, и на этом отрезке развития цивилизации очень важно правильно определить стратегию и тактику процесса познания тайны мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пока мы по-прежнему видим определенную разобщенность двух основных наук, изучающих человека – физиологии и психологии. Объем физиологических дисциплин, которые проходят психологи, недостаточен, чтобы сформировать у них понимание работы мозга – главного субстрата психики. Аналогичная картина и у физиологов, которым психология преподается в сильно урезанном виде. Задача понимания природы психики, по нашему мнению, является никак не ниже задачи освоения ядерной энергией, которая считается величайшим достижением науки XX столетия. Ведь, по большому счету, люди пока не знают, как именно они мыслят и чувствуют – а посему порой делают это удивительно неэффективно. Легендарный мыслитель Гаутама Будда искал счастье человеческое и избавление от страданий в подавлении потребностей и погружении в нирвану забвения. Нам же видится, что избавиться от многих негативных явлений в психике человека можно только поняв принципы ее работы на уровне мозга, который собственно эту психику и воспроизводит.

Общепризнано, что начиная с XX века, в науке утвердилась узкая и сверхузкая специализация. Каждая наука обзавелась набором специальных терминов, так что представители разных отраслей науки с трудом понимают друг друга. Времена таких титанов мысли, как И.М. Сеченов и И.П. Павлов, которые прекрасно ориентировались и в физиологии, и в психологии, ушли в прошлое. Для восстановления этой связи нужно проводить больше междисциплинарных встреч, конференций, круглых столов. Только совместными усилиями мы, люди XXI века, сможем понять природу Психики и Разума – того, что отличает нас от остального косного материального мира. При этом вопрос уже стоит не в том, чтобы защищать "свою" науку от проникновения в нее теорий и понятий "чужой" науки, а в том, действительно ли мы хотим понять, что такое психика и человеческое сознание.

Если хотим – то должны объединить усилия ВСЕХ специалистов, изучающих психические явления и работу мозга ради решения психофизиологической (психофизической) проблемы – загадки генерации мозгом психических явлений. Вопрос только в том, какая наука станет той основой, вокруг которой будет строиться новая модель психики – психология или физиология. Сравнивая прогресс обеих наук в деле познания принципов работы мозга, который, безусловно, является тем органом, который формирует психические явления, можно сделать вывод, что за основу следует взять нейрофизиологию, дополненную открытиями в области психологии, нейрофармакологии, психолингвистики, информатики и других наук о мозге и сознании. Как отмечает Н.И. Чуприкова, "нельзя начинать анализ проблемы мозгового порождения психики, беря в качестве исходного пункта явления внутреннего субъективного мира человека, обладающего языком и сознанием. Наоборот, к их пониманию можно подойти только после понимания того, как порождаются мозгом более ранние в эволюционном отношении и более простые формы психического" [30, стр. 19–20]. Один из авторов данной статьи в свое время писал: "Знание простых принципов может служить ключом к раскрытию невероятно сложных проблем" [11, стр. 5], подразумевая, что, понимая законы работы нервной системы, мы рано или поздно сможем объяснить даже самые сложные ее функции. Если же мы попытаемся понять сразу высшие функции мозга, что делают психологи, анализируя мысли и переживания человека, то вряд ли сможем прийти к понятному результату.

Нам кажется, что к настоящему моменту физиологи готовы работать в тесном взаимодействии с психологами – теми из них, кто искренне заинтересован в данной кооперации и не испытывает профессионального снобизма по отношению к исследователям, работающим с материальными объектами, в то время как "истинные" психологи обитают исключительно в эмпиреях духа. Тем более, что все больше психологов осознают то, что, используя достижения нейронаук, они получают важную информацию, помогающую понять механизмы работы психики. Недаром одна из обзорных статей на эту тему называлась: "Будущее российской психологии – в развитии нейронаук" [52].

Считая изучение деятельности мозга важнейшей и сложнейшей задачей науки, И.П. Павлов указывал на необходимость разнообразия подходов к ее изучению. "Задача на этом, последнем пункте, – писал он, – так невыразимо велика и сложна, что требуются все ресурсы мысли: абсолютная свобода, полная отрешенность от шаблонов, какое только возможно разнообразие точек зрения и способов действий, чтобы обеспечить успех. Все работники мысли, с какой бы стороны они ни подходили к предмету, все увидят нечто на свою долю, а доли всех рано или поздно сложатся в разрешение величайшей задачи человеческой мысли" [53, стр. 100]. Думается, что настала пора совместными усилиями воплотить эти заветы в жизнь.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аристотель*. Поэтика. Риторика. О душе. М. Мир книги. 2007. [*Aristotel*. Poetika. Ritorika. O dushe. [Poetics. Rhetoric. About the soul. Moscow. Mir knigi. 2007. (In Russ].
2. *Балалыкин Д.А., Щеглов А.П., Шок Н.П.* Гален: врач и философ. М. Весть. 2014. [*Balalykin D.A., Shcheglov A.P., Shok N.P.* Galen. Vrach i Filosof [Doctor and Philosopher] Moscow. Vesti. 2014. (In Russ)].
3. *Гиппократ*. Сочинения. [Кн.1]. Избранные книги.М. Биомедгиз. 1936. [*Gippokrat*. Sochineniya. Izbrannye knigi[Essays. Selected books]. Moscow. Biomedgiz. 1936. (In Russ)].
4. *Гобс Т*. Левиафан. Мысль. М. 2001. [*Gobs T*. Leviathan Mysl [Leviathan. Thought] Moscow. 2001. (In Russ)].
5. *Ламетри Жюль*. Человек-машина. Минск. Литература. 1998. [*LaMettrie Jules*. Chelovek-mashina [Human-machine]. Minsk. Literatura. 1998. (In Russ)].
6. *Baars B. J*. The conscious access hypothesis: Origins and recent evidence. Trends in Cognitive Sci. 6(1): 47–52. 2002.
7. *Чуприкова Н.И*. Психика и предмет психологии в свете достижений современной нейронауки. Вопр. психологии. 2: 104–118. 2004. [*Chuprikova N. I.* Psychology and the subject of psychology in the light of the achievements of modern neuroscience. Question of Psychology. 2: 104–118.2004. (In Russ)].
8. *Chalmers D.J*. Facing up to the Problem of Consciousness. J. Consciousness Studies. 2(3): 200–219. 1995.
9. *McGinn C*. Can We Solve the Mind-Body Problem? The Nature of Consciousness: Philosophical Debates. Cambridge. Mass. MIT Press. 529–542. 1997.
10. *Сеченов И.М*. Элементы мысли. СПб. Питер. 2001. [*Sechenov I. M*. Elementy mysli [Elements of thought]. St. Petersburg. Piter. 2001. (In Russ)].
11. *Ноздрачев А.Д*. Физиология вегетативной нервной системы. Л. Медицина. 1983. [*Nozdrachev A.D*. Fiziologiya vegetativnoj nervnoj sistemy [Physiology of the autonomic nervous system]. Leningrad. Medicine. 1983. (In Russ)].
12. *Ноздрачев А.Д., Щербатых Ю.В*. Физиология и психология страха. Природа. 5: 61–67. 2000. [*Nozdrachev A.D., Shcherbatykh Yu.V*. Physiology and psychology of fear. Nature. 5: 61–67. 2000. (In Russ)].
13. *Ноздрачев А.Д., Губанов Н.И*. Сеченов и некоторые вопросы диалектики чувственного познания. Вестн. СПбГУ. 3(2): 143–148. 2005. [*Nozdrachev A.D., Gubanov N.I*. Sechenov and some questions of dialectics of sensory cognition. Vestnik SPbSU. 3(2): 143–148. 2005. (In Russ)].
14. *Черниговский В.Н*. Избранные труды. Серия: Памятники отечественной науки. XX век. СПб. Наука. 2007. [*Chernigovski V.N*. Izbrannye trudy. Seriya: Pamyatniki otechestvennoj nauki. XX vek [Selected works. Series: Monuments of Russian science. XX century]. St. Petersburg. Nauka. 2007. (In Russ)].
15. *Ноздрачёв А.Д., Пальцев М.А*. Отец русской физиологии. К 190-летию со дня рождения И.М.Сеченова. Вестн. Рос. акад. наук. 89(8): 860–873. 2019. [*Nozdrachev A.D., Paltsev M.A*. The founder of Russian physiology to the 190th anniversary of the birth I. M. Sechenov. Bull. Russ. Acad. Sci. 89(8): 860–873. 2019. (In Russ)].
16. *Павлов И.П*. Рефлекс свободы. СПб. Питер. 2001. [*Pavlov I. P.* Refleks svobody [Reflex of freedom]. St. Petersburg. Piter. 2001]. (In Russ).
17. *Павлов И.П*. Двадцатилетний опыт объективного изучения высшей деятельности животных. "Настоящая физиология головного мозга". М. Наука. 1973. [*Pavlov I. P.* Dvadcatiletnij opyt obektivnogo izucheniya vysshej deyatelnosti zhivotnyh. "Nastoyashchaya fiziologiya golovnogo mozga" [Twenty-year experience of objective study of higher activity of animals. "Real physiology of the brain"]. Moscow. Nauka. 1973. (In Russ)].
18. *Klimenko V. M. Golikov J.P.* The Pavlov Department of Physiology: A Scientific History. The Spanish J. Psychology. 6(2): 112–120. 2003.
19. *Щербатых Ю.В*. Нейро-лингвистическое программирование в свете теории условных рефлексов И.П. Павлова. В сб.: Приоритетные направления развития гуманитарных и экономических наук. Воронеж. 111–118. 2017. [*Scherbatykh Yu. V.* Neuro-linguistic programming in the light of the theory of conditioned reflexes I. P. Pavlov. Priority directions of development of the Humanities and economic Sciences. Voronezh. 111–118. 2017. (In Russ)].

20. *Щербатых Ю.В. Ивлева Е.И.* Клинико-психопатологические аспекты и нарушения вегетативного гомеостаза при социальных фобиях. Социальная и клиническая психиатрия. 3: 35–38. 2000. [*Shcherbatykh Yu.V., Ivleva E.I.* Clinical and psychopathological aspects and violations of vegetative homeostasis in social phobias. Social and Clinical Psychiatry. 3: 35–38. 2000. (In Russ)].
21. *Зинченко В.П.* Ответ психолога физиологам (“Работа по психологии” Г.Г. Шпета). Вопросы психологии. 3: 72–82. 2009. [*Zinchenko V.P.* the psychologist’s Answer to physiologists (“Work on psychology” by G.G. Shpet). Questions of Psychology. 3: 72–82. 2009. (In Russ)].
22. *Блум Ф., Лейзерсон А., Хофстедтер Л.* Мозг, разум и поведение. М. Мир. 1988. [*Bloom F., Lazerson A., Hofstadter L.* Mozg, razum i povedenie [Brain, mind and behavior]. Moscow. Mir. 1988. (In Russ)].
23. *Бехтерев В.М.* Объективная психология. М. Наука. 1991. [*Bekhterev V.M.* Obektivnaya psihologiya [Objective psychology]. Moscow. Nauka. 1991.] (In Russ).
24. Личность: теории, эксперименты, упражнения. СПБ. Прайм-Еврознак. 2001. [*Frager R., Fadiman J. Lichnost*: teorii, eksperimenty, uprazhneniya [Personality and personal growth] NY. Longman. 1998 (Russ. Ed. Personality: theories, experiments, exercises. St. Petersburg. Prime-euroznak. Mocsow. Olma-Press. 2001. (In Russ)].
25. *Серебреников В.С.* Независимость психологии от физиологии. Христианское чтение. 7–8: 853–871. 1913. [*Serebrennikov V. S.* Independence of psychology from physiology. Christian Reading. 7–8: 853–871. 1913. (In Russ)].
26. *Бехтерева Н.П.* Нейрофизиологические аспекты психической деятельности человека. 2-е изд. Л. Медицина. 1974. [*Bekhtereva N.P.* Nejrofiziologicheskie aspekty psihicheskoj deyatel’nosti cheloveka. 2-e izd. [Neurophysiological aspects of human mental activity. 2nd ed.] Leningrad. Medicine. 1974. (In Russ)].
27. *Берридж К., Крингельбах М.* Счастливый мозг. В мире науки. 10: 36–42. 2012. [*Berridge K., Kringelbach M.* Happy brain. In the World of Science. 10: 36–42. 2012. (In Russ)].
28. *Дельгадо Хосе.* Мозг и сознание. М. Мир. 1971. [*Delgado J.* Physical Control of the Mind – toward a psychocivilized society. NY. Harper & Row Publ. 1969. (Russ. Ed. *Delgado J.* Mozg i Soznanie. Moscow. Mir. 1971. (In Russ)].
29. *Хьюбел Д.* Глаз, мозг, зрение. М. Мир. 1990. [*Hubel D.* Eye, Brain, and Vision. W.H. Freeman Publ. 1988. (Russ. Ed.: Hubel D. Glaz, mozg, zrenie. Moscow. Mir. 1990. (In Russ)].
30. *Чуприкова Н.И.* Теория отражения, рефлекторная деятельность мозга, осознанные ощущения человека. Вопр. психологии. 4: 10–22. 1980. [*Chuprikova N. I.* Theory of reflection, reflex activity of the brain, conscious human sensations. Question of Psychology. 4: 10–22. 1980. (In Russ)].
31. *Medvedev S.V., Korotkov A.D., Kireev M.V.* Hidden nodes of the brain systems. Human Physiology. 45(5): 552–556. 2019.
32. *Иваницкий А.М.* Мозговая основа субъективных переживаний: гипотеза информационного синтеза. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 46 (2): 241–252. 1996. [*Ivanitsky A.M.* The Brain basis of subjective experiences: the hypothesis of information synthesis. J. Higher Nervous Activity named after I.P. Pavlova. 46 (2): 241–252. 1996. (In Russ)].
33. *Быков К.М.* Кора головного мозга и внутренние органы. Москва. Ленинград. Медгиз. 1947. [*Bykov, K.M.* Kora golovnogo mozga i vnutrennie organy [The cerebral Cortex and the internal organs.] Moscow. Leningrad. Medgiz. 1947. (In Russ)].
34. *Медведев С.В.* Мозг против мозга. Новеллы о мозге. М. Бослен. 2017. [*Medvedev S.V.* Mozg protiv mozga. Novelly o mozge [Brain against brain. Short stories about the brain.] Moscow. Boslen. 2017. (In Russ)].
35. *Соколов Е.Н.* Новые тенденции в развитии психологии. Вопр. психологии. 5: 87–89. 2004. [*Sokolov E.N.* New trends in the development of psychology. Questions of Psychology. 5: 87–89. 2004. (In Russ)].
36. *Соколов Е.Н.* Нейроны сознания. Психология. Журн. высш. школы экономики. 1(2): 3-15. 2004. [*Sokolov E.N.* Neurons of consciousness. Psychology. J. Hgher School of Economics. 1(2): 3–15. 2004. (In Russ)].
37. *Иваницкий А.М.* Сознание и мозг. В мире науки. (11): 85–93. 2005. [*Ivanitsky A.M.* Consciousness and the brain. In the World of Science (11): 85–93. 2005. (In Russ)].
38. *Щербатых Ю.В.* Что есть психика? История и перспективы решения психофизической проблемы. Вестн. по пед. и псих. Южн. Сибири. (3): 120–147. 2020. [*Scherbatykh Yu.V.* What is the psyche? History and prospects for solving a psychophysical problem. Bull. of Ped. and Psych. of South. Siberia. (3): 120–147. 2020. (In Russ)].
39. *Крис Фрит.* Мозг и душа: Как нервная деятельность формирует наш внутренний мир. М. Астрель. CORPUS. 2010. [*Frith, Christopher D.* Making up the mind: how the brain creates

our mental world. Blackwell Publishing.2007 (Russ. Ed.: Frith Christopher D. Mozg i Dusha. Moscow. Astrel. 2010. (In Russ)].
40. *Crick F.* The Astonishing Hypothesis: The Scientific Search for the Soul. New York. Charles Scribner's Sons. 1994.
41. *Koch C.* The Feeling of Life Itself - Why Consciousness is Widespread but Can't be Computed. The MIT Press. 2019.
42. *Paulson S.* On Reconciling Atheism and Meaning in the Universe. The Atlantic. Aug 29. 2012.
43. *Tononi G.* Consciousness as integrated information: a provisional manifesto. Biol. Bull. 215: 219–221. 2008.
44. *Tononi G., Boly M., Massimini M., Koch Ch.* Integrated information theory: from consciousness to its physical substrate. Nature Rev. Neurosci. 17 (7): 450–461. 2016.
45. *Metzinger T.* Being No-One. Cambridge. MA. MIT Press. 2003.
46. *Bartels A., Zeki S.* The neural Basis of Romantic Love. NeuroReport. 11(17): 3829–3834. 2000.
47. *Singer T., Seymour B., O'Doherty J. Kaube H.* Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. Sience. 3030 (5661): 1157–1162. 2004.
48. *Мухин В.Н., Клименко В.М., Калуев А.В.* Итоги 24-й международной мультидисциплинарной конференции по нейронаукам и биологической психиатрии "stress and behavior". Мед. академ. журн. 17 (2): 123–126. 2017. [*Mukhin V.N., Klimenko V.M., Kaluev A.V.* Results of the 24th international multidisciplinary conference on neuroscience and biological psychiatry "stress and behavior". Med. Acad. J. 17(2): 123–126. 2017. (In Russ)].
49. *Чернышев Б.В., Чернышева Е.Г.* Методологические и концептуальные противоречия на стыке психологии и физиологии. Психология. Журн. высш. школы экономики. 8(1): 62–77. 2011. [*Chernyshev B. V., Chernysheva E. G.* Methodological and conceptual contradictions at the intersection of psychology and physiology. Psychology. J. Higher Sch. Economics. 8(1): 62–77. 2011. (In Russ)].
50. *Крик Ф.* Мысли о мозге. Мозг. Под ред. П.В. Симонова. М. Мир. 257–275. 1982. [*Krik F.* Thoughts about the brain. Brain. Ed. by P.V. Simonov. Moscow. Mir. 257–275.1982. (In Russ)].
51. *Островский М.А.* Новые технологии в нейронауках. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105 (11): 1331–1332. 2019. [*Ostrovsky M.A.* New technologies in neuroscience. Russ J. Physiol. 105(11): 1331–1332. 2019. (In Russ)].
52. *Аракелов Г.Г.* Будущее российской психологии – в развитии нейронаук. Нац. психол. журнал. 2: 64–69. 2012. [*Arakelov G.G.*The future of Russian psychology is in the development of neuroscience. National Psych. J. 2: 64–69. 2012. (In Russ)].
53. *Павлов И.П.* Письмо Г.И. Челпанову. Вопр. психологии. 3: 99–100. 1955. [*Pavlov I.P.* Letter to G.I. Chelpanov. Question of Psychology. 3: 99–100. 1955. (In Russ)].

Physiology and Psychology – Dialectics of Interaction in Solving a Psychophysiological Problem

A. D. Nozdrachev[a, b, *], and Yu. V. Scherbatykh[c]

[a] *Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*
[b] *Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*
[c] *Voronezh Branch of the Moscow University of Humanities and Economics, Voronezh, Russia*
**e-mail: a.d.nozdrachev@mail.ru*

The review is devoted to the history of solving one of the most fundamental problems of humanity: how does the material brain give birth to a psyche devoid of the attributes of materiality? This is a so-called "psychophysical" or "psychophysiological" problem ("mind-body problem"). The article provides an analytical analysis of various approaches and concepts used by representatives of different Sciences for more than two thousand years to solve this riddle. The emphasis is on two Sciences – psychology and physiology, in which psychologists and physiologists sought a solution to a psychophysical problem based on the principles and methods of their science. The article shows that advances in the field of neurophysiology and neurobiology are slowly but inevitably bringing us closer to solving the "difficult problem of consciousness", while the descriptive and speculative approaches of philosophers and psychologists have not yet allowed us to reveal the principles of the psyche and understand the mechanisms of its formation by the brain. Nevertheless, the authors of the article believe that only the joint work of physiologists and psychologists on a common plan, with the development of a single concept of the

search for truth and in close cooperation with representatives of other neuroscience, can lead humanity to unravel the great mystery of nature: the discovery of the principles and mechanisms of the psyche and consciousness.

Keyword: psyche, consciousness, mind-body problem, the psychophysical problem, psycho-physiological problem, mind-brain problem, brain and consciousness, neuroscience's, neurophysiology, psychophysiology, difficult problem of consciousness, brain-consciousness, soul-body

ЦИТИРОВАТЬ:

Ноздрачев А.Д., Щербатых Ю.В. Физиология и психология – диалектика взаимодействия при решении психофизиологической проблемы. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(2): 154–176. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020047

TO CITE THIS ARTICLE:

Nozdrachev A.D., Scherbatykh Yu.V. Physiology and psychology – dialectics of interaction in solving a psychophysiological problem. Russian Journal of Physiology. 107(2): 154–176. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020047

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 2, с. 177–186

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК КОЛМЕРА У КРЫС ЛИНИИ SHR ПОСЛЕ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2021 г. О. В. Кирик[1, *], Д. Л. Цыба[1], О. С. Алексеева[1, 3], М. Э. Колпакова[2], А. А. Яковлева[2], Д. Э. Коржевский[1]

[1]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
[2]Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-образовательный институт биомедицины, Санкт-Петербург, Россия
[3]Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
**E-mail: olga_kirik@mail.ru*

Поступила в редакцию 05.10.2020 г.
После доработки 05.11.2020 г.
Принята к публикации 05.11.2020 г.

Клетки Колмера (эпиплексусные макрофаги) являются наименее изученной популяцией среди фагоцитирующих клеток в головном мозге млекопитающих. В настоящей работе изучена реакция этих клеток на ишемическое повреждение головного мозга, вызванное непродолжительным прекращением кровотока в бассейне средней мозговой артерии. В работе были использованы крысы спонтанно гипертензивной линии SHR и нормотензивной линии WKY. Клетки Колмера нормотензивных животных линии WKY имели небольшой объем перинуклеарной цитоплазмы с концентрацией белка Iba-1 в кортикальном слое и характерные тонкие, иногда извитые отростки. Умеренная активация, вызванная повышенным артериальным давлением, у контрольных крыс линии SHR сопровождалась увеличением объема перинуклеарной цитоплазмы и появлением многочисленных прямых тонких отростков. Дальнейшая активация, вызванная ишемией, приводила к исчезновению отростков и приобретению клетками округлой формы. Данные структурные перестройки сопровождались исчезновением градиента концентрации белка Iba-1 в цитоплазме. Также в рамках выполненного исследования была впервые обнаружена внутриядерная аккумуляция цитоплазматического белка Iba-1 в клетках Колмера, независимая от их активации, указывающая на полифункциональность данного белка в клетке. Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении клеток Колмера в реакции головного мозга на повреждение.

Ключевые слова: клетки Колмера, крысы SHR, ишемия, головной мозг

DOI: 10.31857/S0869813921010052

Клетки Колмера или поверхностные клетки сосудистых сплетений желудочков (эпиплексусные клетки) головного мозга представляют собой особую популяцию фагоцитирующих клеток головного мозга млекопитающих и человека, которые в отличие от микроглии, происходящей из желточного мешка [1], имеют костномозговое происхождение [2]. Зрелые клетки Колмера по своей ультраструктуре напоминают клетки амебоидной микроглии [3, 4], они распластываются по апикальной поверхности эпителиоцитов сосудистого сплетения (Choroid plexus – ChPl) [5] и являются важным компонентом гематоликворного барьера [2]. Их основная функ-

ция состоит в утилизации посторонних веществ, попадающих в цереброспинальную жидкость при нарушении барьерной системы головного мозга, что может иметь место при различных повреждающих воздействиях и патологических процессах [5–7]. Существует мнение, что эти клетки фагоцитируют фрагменты цитоплазмы эпителиальных клеток ChPl, содержащие неутилизируемые вещества и поврежденные органеллы [3, 8]. Одной из причин, вызывающих нарушение барьерной системы мозга, может стать ишемическое повреждение, вызванное нарушением кровотока. Оно приводит к деструктивным изменениям нервной ткани и развитию локального воспаления [9, 10], в реализации которого принимают участие все популяции фагоцитирующих клеток головного мозга. Эти клетки могут рассматриваться как предполагаемые мишени для терапевтического вмешательства, направленного на увеличение нейропротекторного потенциала и уменьшение нейровоспаления. Существует большое количество данных, касающихся реакции микроглии на ишемический инсульт [11], тогда как данные о реакции клеток Колмера остаются немногочисленными [6, 12]. При формировании ишемического очага происходит нарушение гематоэнцефалического барьера, и в кровь выделяются факторы, обозначаемые как DAMP (damage associated molecular patterns). Попадая через кровеносные сосуды ChPl в цереброспинальную жидкость, они оказывают влияние на клетки Колмера, что приводит к усилению воспалительной реакции [13]. В связи с этим клетки Колмера следует рассматривать как важную составляющую в развитии нейровоспалительного процесса.

Одним из факторов риска развития цереброваскулярной болезни является артериальная гипертензия, что необходимо учитывать при моделировании соответствующей патологии на лабораторных животных. Особого внимания в этом контексте заслуживает линия крыс SHR (Spontaneously Hypertensive Rats), полученная в 1963 г. японскими учеными [14]. Стойкое повышение артериального давления у крыс этой линии может достигать 200 мм рт. ст. уже в возрасте 12 нед., что связано с нарушением функции нескольких генов, участвующих в регуляции артериального давления [15]. В качестве контроля к крысам линии SHR, как правило, используют нормотензивную линию WKY (Wistar–Kyoto), поскольку крысы линии SHR были выведены на основе животных линии Wistar–Kyoto [14].

Целью настоящего исследования стало изучение структурных и цитохимических характеристик клеток Колмера сосудистых сплетений боковых желудочков головного мозга интактных крыс линии SHR и крыс линии SHR, перенесших 30-минутную фокальную ишемию.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены на спонтанно гипертензивных крысах-самцах линии SHR в возрасте 10–12 нед. (АД 165–185 мм рт. ст., $n = 10$). Содержание животных и экспериментальные манипуляции осуществляли с учетом “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) и Федерального Закона РФ “О защите животных от жестокого обращения” от 01.01.1997 г., Хельсинкской декларации 1975 г. и ее пересмотренного варианта 2000 г. План работы одобрен Локальным этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (протокол № 3/19 от 25.04.2019 г.). Индукцию ишемии проводили при помощи эндоваскулярной окклюзии левой средней мозговой артерии под общей анестезией (тиопентал натрия, 60 мг/кг) [16]. Продолжительность нарушения кровообращения в бассейне левой средней мозговой артерии в каждом случае составляла 30 мин, а время реперфузии – 48 ч. Контролем служил головной мозг интактных животных линии SHR (артериальное давление 165–185 мм рт. ст., $n = 3$), в качестве дополнительного контроля, позволяющего оценить возможный вклад гипертензии в

полученные на крысах SHR результаты, использовали головной мозг крыс линии WKY (артериальное давление 105–115 мм рт. ст., $n = 3$). Всего в анализе участвовало 16 животных. Животные были получены из биоколлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных выводили из эксперимента с помощью передозировки тиопентала натрия. Головной мозг извлекали с сохранением мягкой мозговой и паутинной оболочек, фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [17], обезвоживали и заливали в парафин обычным способом. Морфологическому исследованию подвергали фронтальные срезы конечного мозга (–0.66 мм ± 0.06 мм по отношению к брегме согласно анатомического атласу [18]). В качестве обзорной нейрогистологической окраски была использована окраска крезиловым фиолетовым по Нисслю.

В качестве цитоспецифического маркера клеток Колмера был выбран белок Iba-1, который является общим маркером для клеток микроглии и всех мононуклеарных фагоцитов [19]. Для иммуногистохимического выявления Iba-1 использовали первичные кроличьи поликлональные антитела к Iba-1 в разведении 1 : 600 (Biocare Medical, США). В качестве вторичных реагентов для выявления иммуноглобулинов кролика использовали реагент HRP Conjugate из набора reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США). Пероксидазную метку выявляли с использованием диаминобензидинового хромогена (DAB+; Dako, Дания). После постановки иммуногистохимических реакций часть срезов докрашивали гематоксилином.

При проведении иммунофлуоресцентных реакций для выявления Iba-1 с одновременной подкраской ядер использовали первичные козьи поликлональные антитела к Iba-1 в разведении 1 : 600 (Abcam, Великобритания). В качестве вторичного реагента для выявления иммуноглобулинов козы использовали кроличьи поликлональные антитела, коньюгированные с флуорохромом Cy3 (Sigma, США), которые, в свою очередь, выявляли с помощью реагента HRP Conjugate из набора reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience, США) и стрептавидина, конъюгированного с флуорохромом Cy3, в который был добавлен ядерный флуоресцентный краситель SYTOX Green (0.5 мкмоль) из набора Select FX (Invitrogen, США).

Анализ препаратов проводили с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 800 (Zeiss, Германия), оснащенного системой Airyscan.

Морфометрические измерения проводились в программе ImageJ [20], статистическая обработка данных была проведена с использованием языка программирования R в среде для разработки RStudio (США). Нормальность распределения признаков оценивали с помощью формального критерия Шапиро–Уилка. Для оценки равенства дисперсий признака использовали F-критерий Фишера. Оценку значимости различий между группами проводили с использованием двухвыборочного *t*-теста Стьюдента, внутригрупповые сравнения зависимых признаков оценивали с помощью парного *t*-теста Стьюдента. При несоблюдении условия нормальности распределения признака использовали непараметрические критерии Манна–Уитни и Вилкоксона соответственно. Данные представлены в виде $X \pm \sigma$ (среднее значение ± стандартное отклонение), различия расценивались как статистически значимые при $p < 0.05$. Для оценки влияния степени ишемического повреждения на степень расширения желудочка был проведен дисперсионный анализ ANOVA и пост-хок тест Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ препаратов, окрашенных крезиловым фиолетовым по Нисслю, показал, что у контрольных животных линий WKY и SHR в ткани мозга отсутствовали признаки дистрофических и нейродегенеративных процессов. Желудочки мозга крыс гипертензивной линии SHR не имели достоверных морфологических признаков гидроцефалии. Площади желудочков мозга крыс линии SHR не имели достоверных отличий от площади соответствующих желудочков мозга крыс линии WKY

($p > 0.05$). Площади желудочков правого и левого полушарий у контрольных животных линий SHR и WKY также не имели достоверных отличий между собой ($p > 0.05$). Кровеносные сосуды ChPl не были расширены ни в одной из контрольных групп.

У экспериментальных животных линии SHR через 48 ч после односторонней ишемии очаги повреждения локализовались в стриатуме и/или базолатеральной области левого полушария, не затрагивая эпендиму и субэпендимную область. В зависимости от локализации очага ишемии и степени деструкции ткани различали три варианта повреждения: незначительное локальное повреждение нейронов, которое затрагивало только стриатум ($n = 4$); умеренное локальное повреждение нейронов, которое затрагивало стриатум и близлежащие структуры без очаговой деструкции нервной ткани ($n = 4$); ишемический инфаркт части левого полушария, сопровождающийся очаговой некротической деструкцией ткани и развитием воспалительной реакции ($n = 2$). Кровеносные сосуды в ткани мозга и ChPl ишемизированного полушария во всех случаях были расширены. Измерение площади желудочков на срезах мозга показало, что площади правых (контрлатеральных) желудочков экспериментальных животных линии SHR и контрольных животных имеют достоверные отличия ($p < 0.05$). Однако сравнение площадей левых (ипсилатеральных) желудочков экспериментальных животных линии SHR с левыми желудочками контрольных животных таких отличий не выявило ($p > 0.05$). Площади желудочков правого и левого полушария у экспериментальных животных линии SHR имели достоверные отличия между собой ($p < 0.05$). При оценке влияния степени повреждения на площадь желудочков было показано, что площадь контрлатерального желудочка значимо изменяется при наиболее выраженном повреждении ($F = 0.51$, $p = 0.005$).

Клетки Колмера при окраске крезиловым фиолетовым отчетливо не выявлялись. В противоположность окраске крезиловым фиолетовым при постановке иммуногистохимической реакции на белок Iba-1, клетки Колмера идентифицировались отчетливо. Они выглядели как яркоокрашенные Iba-1-иммунопозитивные (Iba-1-ИП) клетки на поверхности неокрашенного эпителия ворсинок ChPl (рис. 1). Кроме клеток Колмера Iba-1-ИП реакция регистрировалась в клетках, не связанных с ChPl, а находящихся в составе цереброспинальной жидкости. Часть этих Iba-1-ИП клеток располагалась в непосредственной связи с эпендимой (супраэпендимные клетки). У контрольных крыс линии WKY клетки Колмера имели уплощенную форму, и на фронтальных срезах обнаруживались преимущественно участки цитоплазмы и крупные отростки – цитоподии. Ядра клеток редко попадали в плоскость среза (рис. 1*A*). У контрольной группы крыс линии SHR часть клеток Колмера имела округлую форму (рис. 1*B*). Также встречались Iba-1-ИП клетки в цереброспинальной жидкости. Достоверных различий в количестве этих клеток между двумя контрольными группами линий SHR и WKY выявлено не было. Помимо клеток Колмера у контрольных животных линий WKY и SHR Iba-1-ИП структурами в ткани мозга были клетки типичной разветвленной микроглии, субэпендимные микроглиоциты и отдельные периваскулярные клетки (периваскулярные макрофаги).

После ишемии подавляющее большинство клеток Колмера приобретало округлую форму (рис. 1*C*). Их количество увеличивалось как в ChPl поврежденного, так и контрлатерального полушария. Количество Iba-1-ИП клеток в цереброспинальной жидкости желудочков ишемизированного и контрлатерального полушарий тоже увеличивалось ($p < 0.05$). Часть этих клеток располагалась вблизи эпендимы. Наряду с указанными изменениями регистрировали и изменения состояния микроглиальных клеток. Iba-1-ИП клетки типичной разветвленной микроглии встречались в контрлатеральном полушарии и областях, отдаленных от очага повреждения. В ишемизированном полушарии Iba-1-ИП микроглиоциты имели характерные морфологические признаки активации: крупное тело клетки с короткими и

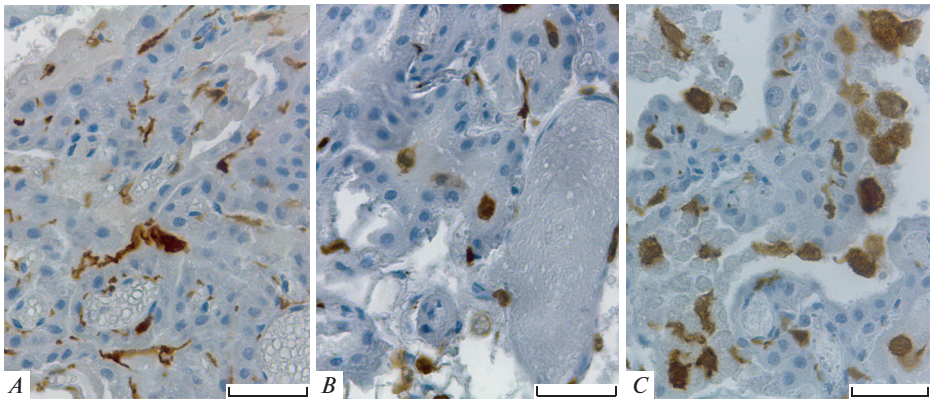

Рис. 1. Клетки Колмера сосудистого сплетения боковых желудочков головного мозга.
A – контрольное животное нормотензивной линии Wistar–Kyoto; *B* – контрольное животное гипертензивной линии SHR (Spontaneously Hypertensive Rats); *C* – крыса гипертензивной линии SHR через 48 ч после 30-минутной окклюзии левой средней мозговой артерии. Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1 (коричневый цвет). Ядра подкрашены гематоксилином (синий цвет).
Масштабный отрезок равен 40 мкм.

Fig. 1. Kolmer cells of the choroid plexus of the lateral ventricles of the brain.
A – control animal of normotensive Wistar–Kyoto line; *B* – control animal of hypertensive SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) line; *C* – rat of hypertensive SHR line 48 h after 30 min of the left middle cerebral artery occlusion. Immunohistochemical reaction for Iba-1 protein, visualisation with DAB+ chromogen (brown), tint by hematoxylin (blue).
Scale bar — 40 μm.

толстыми отростками, что соответствовало характерным чертам амебоидных микроглиоцитов. Вблизи очага повреждения встречались преимущественно амебоидные микроглиоциты. Субэпендимные микроглиоциты в ишемизированном полушарии также имели морфологические признаки активации.

Использование методов конфокальной лазерной микроскопии показало, что мелкогранулярный продукт реакции (белок Iba-1) присутствует в цитоплазме и ядре клетки Колмера (рис. 2). В клетках Колмера контрольных животных линии WKY белок Iba-1 концентрировался преимущественно в кортикальном слое цитоплазмы (рис. 2*A*). У контрольных крыс линии SHR в клетках округлой и овальной формы не наблюдалось градиента концентрации белка Iba-1 в цитоплазме, увеличивался объем перинуклеарной цитоплазмы, хорошо визуализировались небольшие неветвящиеся тонкие отростки, напоминающие филоподии (рис. 2*B*). У крыс экспериментальной группы линии SHR Iba-1-ИП клетки были округлой или овальной формы с большим объемом перинуклеарной цитоплазмы, без отростков или с небольшими цитоплазматическими выростами. При этом белок Iba-1 распределялся в цитоплазме более равномерно, чем в контроле (рис. 2*C*). Форма ядер клеток Колмера характеризовалась полиморфностью от простых округлых до бобовидных и многолопастных форм (рис. 2). Также было отмечено присутствие белка Iba-1 в ядре клетки. При этом накопление белка в ядре не совпадало с внутриядерными скоплениями гетерохроматина.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют о том, что Iba-1-ИП клетки на поверхности эпителия ворсинок ChPl действительно являются клетками Колмера, которые

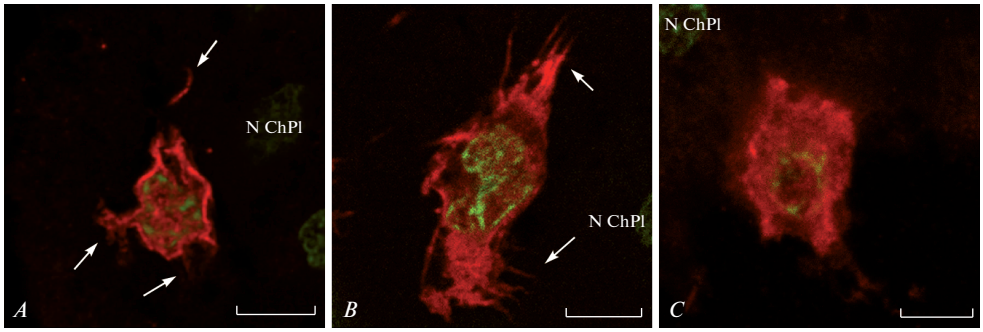

Рис. 2. Клетки Колмера на поверхности эпителия сосудистого сплетения боковых желудочков головного мозга. *A* – контрольное животное нормотензивной линии Wistar–Kyoto; *B* – контрольное животное гипертензивной линии SHR (Spontaneously Hypertensive Rats); *C* – крыса гипертензивной линии SHR через 48 ч после 30-минутной окклюзии левой средней мозговой артерии. N ChPl – ядра эпителиоцитов сосудистого сплетения. Стрелками указаны отростки клеток.
Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1 (визуализация с помощью флуорохрома Cy3, красный цвет). Ядра подкрашены SYTOX Green, зеленый цвет).
Конфокальная лазерная микроскопия. Конфокальный лазерный микроскоп LSM 800 (Zeiss, Германия), Объектив Plan-Apochromat 63×/1.40 oil DIC M27. Одиночный оптический срез толщиной 0.2 мкм. Масштабный отрезок равен 5 мкм.
Fig. 2. Kolmer cells on the surface of the choroid plexus epithelium of the lateral ventricles of the brain. *A* – control animal of the normotensive line Wistar–Kyoto; *B* – control animal of the hypertensive SHR line; *C* – rat of hypertensive SHR line 48 h after 30 min of the left middle cerebral artery occlusion. N ChPl – nuclei of choroid plexus epithelial cells. The arrows point to the cell processes.
Immunohistochemical reaction for Iba-1 protein, visualisation with Cy3 fluorochrome (red). Nuclei are stained with SYTOX Green (green).
Confocal laser microscopy. Confocal laser microscope LSM 800 (Zeiss, Germany), objective Plan-Apochromat 63×/1.40 oil DIC M27. Single optical section 0.2 μm thick.
Scale bar – 5 μm.

согласно немногочисленным данным характеризуются как клетки округлой или звездчатой формы с длинными отростками [4, 5]. Ишемическое воздействие вызывает их активацию, которая сопровождается исчезновением отростков и приобретением клетками округлой формы. Эти изменения, вероятно, необходимы для более эффективного фагоцитоза, в реализации которого принято считать важным участие белка Iba-1 [18, 21, 22]. У контрольных крыс линии SHR на поверхности ChPl также встречаются отдельные активированные формы клеток Колмера, которые отсутствуют у контрольных животных линии WKY, что может быть связано с меньшей устойчивостью гематоликворного барьера на фоне артериальной гипертензии. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о повышении проницаемости гематоликворного барьера у крыс линии SHR [23]. При активации часть клеток Колмера может открепляться от эпителия ChPl, с током цереброспинальной жидкости разноситься по всему объему желудочка и попадать в другие ликвороносные пространства. По-видимому, некоторые из этих клеток способны прикрепляться к поверхности эпендимоцитов и участвовать вместе с ними в формировании ликвороэнцефалического барьера. Исходя из этого предположения, все перечисленные клетки составляют единую популяцию. Однако это предположение может оказаться и ошибочным, поскольку существуют данные о миграции амебоидных микроглиоцитов из ткани мозга в полость желудочка и далее до сосудистого сплетения [24], то есть часть внутрижелудочковых клеток может иметь родство с микроглиоцитами.

Активацию клеток Колмера некоторые авторы связывают с развитием нейровоспалительной реакции, последствием которой является увеличение объема желудочков мозга [25]. В нашем исследовании у ишемизированных животных линии SHR было зарегистрировано увеличение площади желудочков, но во всех случаях это желудочки контрлатерального, а не ипсилатерального (в котором происходило нарушение кровотока) полушария. Отсутствие увеличения ипсилатерального желудочка, скорее всего, связано с сохраняющимся выраженным отеком ипсилатерального полушария и, как следствие, сдавлением желудочка.

С использованием конфокальной лазерной микроскопии нам удалось показать более равномерное распределение белка Iba-1 в цитоплазме клеток, имеющих признаки активации, у гипертензивных животных линии SHR. Это может быть связано с увеличением его концентрации за счет продолжающегося синтеза [26, 27]. Благодаря цитоплазматической локализации белка Iba-1 хорошо визуализируются отростки клеток, которые исчезают у клеток Колмера при постишемической активации, но сохраняются у контрольных крыс как линии WKY, так и линии SHR. Ранее в исследованиях экспрессии микроглиального маркера Iba-1 у нормотензивных крыс реакции клеток Колмера не изучались [26–27 и др.].

Интересным является факт присутствия Iba-1 в ядрах всех клеток Колмера независимо от их функционального состояния. Ранее нами было показано наличие крупных скоплений Iba-1 в ядрах микроглиоцитов у человека [28, 29]. У крыс линии Вистар в микроглиоцитах стриатума были обнаружены мелкие внутриядерные гранулы [30]. Как и в случае с микроглиоцитами, в рамках настоящего исследования не удается определить взаимосвязь между гранулами белка и скоплением гетерохроматина. Причины локализации цитоплазматического белка Iba-1, участвующего в фагоцитозе, в ядре в настоящее время остаются невыясненными. Существуют косвенные данные о влиянии белка Iba-1 на транскрипционную активность клетки [31–33], что свидетельствует в пользу полифункциональности данного белка, который может выполнять в ядре роль транскрипционного фактора.

Таким образом, гипертензия и ишемическое повреждение вызывают активацию клеток Колмера, которая сопровождается исчезновением отростков и увеличением размеров тела клетки. Полученные факты указывают на непосредственную вовлеченность клеток Колмера в реакции головного мозга на ишемическое и гемодинамическое повреждение. В рамках выполненного исследования была впервые обнаружена внутриядерная аккумуляция связанного с фагоцитозом цитоплазматического белка Iba-1 в клетках Колмера, которая наблюдается вне зависимости от их функционального состояния (активации).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят д. м. н., проф. Лобова Г.И. заведующего лабораторией физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем Института физиологии им. И.П. Павлова РАН за консультации и оказанную помощь в измерении артериального давления исследуемых животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины” и государственного задания Научно-образовательного института биомедицины (лаборатория патофизиологии) Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова” Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении исследования были соблюдены все применимые международные принципы использования животных. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ “ИЭМ” (протокол № 3/19 от 25.04.2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alekseeva O.S., Kirik O.V., Gilerovich E.G., Korzhevskii D.E.* Microglia of the Brain: Origin, Structure, Functions. J. Evol. Biochem. Physiol. 55: 257–268. 2019.
2. *Goldmann T., Wieghofer P., Jordao M.J., Prutek F., Hagemeyer N., Frenzel K., Amann L., Staszewski O., Kierdorf K., Krueger M., Locatelli G., Hochgerner H., Zeiser R., Epelman S., Geissmann F., Priller J., Rossi F.M.V., Bechmann I., Kerschensteiner M., Linnarsson S., Jung S., Prinz M.* Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. Nat. Immunol. 17(7): 797–805. 2016.
3. *Ling E.A.* Ultrastructure and origin of epiplexus cells in the telencephalic choroid plexus of postnatal rats studied by intravenous injection of carbon particles. J. Anat. 129(3): 479–492. 1979.
4. *Tamega O.J., Tirapelli L.F., Petroni S.* Scanning electron microscopy study of the choroid plexus in the monkey (*Cebus apella apella*). Arq. Neuropsiquiatr. 58(3B): 820–825. 2000.
5. *Wan Y., Hua Y., Garton H.J.L., Novakovic N., Keep R.F., Xi G.* Activation of epiplexus macrophages in hydrocephalus caused by subarachnoid hemorrhage and thrombin. CNS Neurosci. Ther. 25(10): 1134–1141. 2019.
6. *Коржевский Д.Э.* Сосудистое сплетение головного мозга и структурная организация гематоликворного барьера у человека. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2(1): 5–14. 2003. [*Korzhevskii D.E.* Choroid plexus and structural organization of blood-CSF barrier in human. Regional Blood Circulation and Microcircul. 2(1): 5–14. 2003. (In Russ)].
7. *Maxwell W.L., Hardy I.G., Watt C., McGadey J., Graham D.I., Adams J.H., Gennarellie T.A.* Changes in the choroid plexus, responses by intrinsic epiplexus cells and recruitment from monocytes after experimental head acceleration injury in the non-human primate. Acta Neuropathol. 84(1): 78–84. 1992.
8. *Peters A., Swan R.C.* The choroid plexus of the mature and aging rat: the choroidal epithelium. Anat. Rec. 194(3): 325–353. 1979.
9. *Chamorro A., Meisel A., Planas A.M., Urra X., van de Beek D., Veltkamp R.* The immunology of acute stroke. Nat. Rev. Neurol. 8(7): 401–410. 2012.
10. *Iadecola C., Anrather J.* The immunology of stroke: from mechanisms to translation. Nat. Med. 17(7): 796–808. 2011.
11. *Xiong X.Y., Liu L., Yang Q.W.* Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. Prog. Neurobiol. 142: 23–44. 2016.
12. *Pedragosa J., Salas-Perdomo A., Gallizioli M., Cugota R., Miro-Mur F., Brianso F., Justicia C., Perez-Asensio F., Marquez-Kisinousky L., Urra X., Gieryng A., Kaminska B., Chamorro A., Planas A.M.* CNS-border associated macrophages respond to acute ischemic stroke attracting granulocytes and promoting vascular leakage. Acta Neuropathol. Commun. 6(1): 76. 2018.
13. *Joukal M., Klusakova I., Solar P., Kuklova A., Dubovy P.* Cellular reactions of the choroid plexus induced by peripheral nerve injury. Neurosci. Lett. 628: 73–77. 2016.
14. *Okamoto K., Aoki K.* Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Jpn. Circ. J. 27: 282–293. 1963.
15. *Журавлев Д.А.* Модели артериальной гипертензии. Спонтанно-гипертензивные крысы. Артериальная гипертензия. 15(6): 721–723. 2009. [*Zhuravlyov D.A.* Hypertension models. spontaneously hypertensive rats. Arterial Hypertension. 15(6): 721–723. 2009. (In Russ)].
16. *Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Baisa A.E., Vlasov T.D.* Simulation of unilateral ischemic injury to the striatal neurons inflicted by short-term occlusion of the middle cerebral artery. Bull. Exp. Biol. Med. 147(2): 255–256. 2009.
17. *Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P.* Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. Eur. J. Histochem. 59(3): 233–237. 2015.
18. *Paxinos G., Watson Ch.* The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Fourth Edition. San Diego. Acad. Press. 1998.

19. *Korzhevskii D.E., Kirik O.V.* Brain microglia and microglial markers. Neurosci. Behav. Physiol. 46(3): 284–290. 2016.
20. *Abramoff M.D., Magalhaes P.J., Ram S.J.* Image Processing with ImageJ. Biophotonics Internat. 11(7): 36–42. 2004.
21. *Ohsawa K., Imai Y., Kanazawa H., Sasaki Y., Kohsaka S.* Involment of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. J. Cell Sci. 133(17): 3073–3084. 2000.
22. *Ohsawa K., Imai Y., Sasaki Y., Kohsaka S.* Microglia/macrophages-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. J. Neurochem. 88(4): 844–856. 2004.
23. *Al-Sarraf H., Philip L.* Effect of hypertension on the integrity of blood brain and blood CSF barriers, cerebral blood flow and CSF secretion in the rat. Brain Res. 975(1–2): 179–188. 2003.
24. *Ling E.A., Tseng C.Y., Wong W.C.* An electron microscopical study of the epiplexus and supraependymal cells in the prenatal rat brain following a maternal injection of 6-aminonicotinamide. J. Anat. 140: 119–129. 1985.
25. *Gu C., Hao X., Li J., Hua Y., Keep R.F., Xi G.* Effects of minocycline on epiplexus macrophage activation, choroid plexus injury and hydrocephalus development in spontaneous hypertensive rats. J. Cerebr. Blood Flow Metab. 39(10): 1936–1948. 2019.
26. *Patel A.R., Ritzel R., McCullough L.D., Liu F.* Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol. 5(2): 73–90. 2013.
27. *Ito D., Tanaka K., Suzuki S., Dembo T., Fukuuchi Y.* Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. Stroke. 32(5): 1208–1215. 2001.
28. *Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Сырцова М.А.* Микроглия черного вещества головного мозга человека. Мед. акад. журн. 14(4): 68–72. 2014. *[Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Sukhorukova E.G., Syrszova M.A.* Microglia of the human substantia nigra. Med. Acad. J. 14(4): 68–72. 2014. (In Russ)].
29. *Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Алексеева О.С., Сухорукова Е.Г., Сырцова М.А.* Внутриядерное накопление белка Iba-1 в микроглиоцитах головного мозга человека. Морфология. 149(2): 73–76. 2016. [*Korzhevskii D.E., Kirik O.V., Alekseeva O.S., Sukhorukova E.G., Syrtsova M.A.* Intranuclear accumulation of Iba-1 protein in microgliocytes in the human brain. Neurosci. Behav. Physiol. 47(4): 435–437. 2017. (In Russ)].
30. *Коржевский Д.Э., Григорьев И.П., Гусельникова В.В., Колос Е.А., Петрова Е.С., Кирик О.В., Суфиева Д.А., Разенкова В.А., Антипова М.В., Черныш М.В.* Иммуногистохимические маркеры для нейробиологии. Мед. акад. журн. 19(4): 7–24. 2019. [*Korzhevskii D.E., Grigor'ev I.P., Gusel'nikova V.V., Kolos E.A., Petrova E.S., Kirik O.V., Sufieva D.A., Razenkova V.A., Antipova M.V., Chernysh M.V.* Immunohistochemical markers for neurobiology. Med. Acad. J. 19(4): 7–24. 2019. (In Russ)].
31. *Schulze J.O., Quedenau C., Roske Y.* Structural and functional characterization of human Iba proteins. FEBS J. 275(18): 4627–4640. 2008.
32. *Berglund L.M., Kotova O., Osmark P., Grufman H., Xing C., Lydrup M.L., Goncalves I., Autieri M.V., Gomez M.F.* NFAT regulates the expression of AIF-1 and IRT-1: yin and yang splice variants of neointima formation and atherosclerosis. Cardiovasc. Res. 93(3): 414–423. 2012.
33. *Subramaniam P.S., Green M.M., Larkin J., Torres B.A., Johnson H.M.* Nuclear translocation of IFN-gamma is an intrinsic requirement for its biologic activity and can be driven by a heterologous nuclear localization sequence. J. Interferon Cytokine Res. 21(11): 951–959. 2001.

Alterations in Kolmer Cells in SHR Line Rats after Brain Ischemia

O. V. Kirik[a, *], D. L. Tsyba[a], O. S. Alekseeva[a, c], M. E. Kolpakova[b], A. A. Jakovleva[b], and D. E. Korzhevskii[a]

[a] *Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia*

[b] *Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia*

[c] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*

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

Kolmer cells (epiplexus macrophages) are the least studied population of phagocytic cells in the mammalian brain. In the present work, we studied the response of these cells to high blood pressure and ischemic brain injury caused by a short middle cerebral artery occlusion. We used spontaneously hypertensive SHR and normotensive WKY rats. Kolmer cells of normotensive WKY animals had a small volume of perinuclear cytoplasm with a cortical concentration of Iba-1 protein. These cells had characteristic thin, some-

times tortuous processes. Moderate activation due to high blood pressure in SHR rats was accompanied by an increase in the perinuclear cytoplasm volume and the appearance of numerous straight thin processes. Further activation caused by ischemia led to the disappearance of processes and the cells became round. The structural rearrangements were accompanied by the disappearance of the Iba-1 protein concentration gradient in the cytoplasm. Also, the intranuclear accumulation of the cytoplasmic Iba-1 protein in Kolmer cells was first discovered, independent of their activation. That indicates the polyfunctionality of this protein in the cell. The obtained results point to the involvement of Kolmer cells in the brain's response to injury.

Keywords: Kolmer cells, SHR rats, ischemia, brain

ЦИТИРОВАТЬ:

Кирик О.В., Цыба Д.Л., Алексеева О.С., Колпакова М.Э., Яковлева А.А., Коржевский Д.Э. Изменения клеток Колмера у крыс линии shr после ишемии головного мозга. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(2): 177–186. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921010052

TO CITE THIS ARTICLE:

Kirik O.V., Tsyba D.L., Alekseeva O.S., Kolpakova M.E., Jakovleva A.A., Korzhevskii D.E. Alterations in Kolmer cells in shr line rats after brain ischemia. Russian Journal of Physiology. 107(2): 177–186. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921010052

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 2, с. 187–202

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ОДНОКРАТНОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ У КРЫС В ВОЗРАСТЕ 10 ДНЕЙ НА СЕНСОМОТОРНОЕ РАЗВИТИЕ И ПОВЕДЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

© 2021 г. Д. Д. Хухарева[1], Ю. А. Суханова[1], Е. А. Себенцова[2], Н. Г. Левицкая[1, 2, *]

[1]Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

[2]Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 20.08.2020 г.
После доработки 07.11.2020 г.
Принята к публикации 24.11.2020 г.

Гипоксия плода или новорожденного является одной из основных причин неонатальной смертности и вызывает долговременные нарушения моторных и когнитивных функций. Целью представленной работы явилось изучение эффектов однократной нормобарической гипоксии у крыс в возрасте 10 дней (модель доношенной беременности человека). Самцов и самок крыс линии Вистар подвергали гипоксическому воздействию длительностью 2 ч при содержании кислорода 8%. Контрольные животные содержались в тех же условиях при нормальном содержании кислорода. С 11-го по 35-й день жизни оценивали уровень физического и моторного развития, двигательную и исследовательскую активность, уровень тревожности. Уровень летальности при использованном воздействии составил 21.1%. У крыс обоего пола отмечалось замедление прироста массы тела и нарушение воспроизведения моторных рефлексов. Нарушения координации движений и способности поддерживать равновесие были зарегистрированы у самцов, но не самок крыс, перенесших неонатальную гипоксию. У самок крыс аделесцентного возраста, подвергавшихся гипоксии, отмечалось увеличение тревожности в тесте приподнятый крестообразный лабиринт. Полученные результаты свидетельствуют о гендер-зависимом характере эффектов неонатальной гипоксии. Использованную методику можно рассматривать в качестве модели гипоксического повреждения мозга доношенных новорожденных.

Ключевые слова: перинатальная гипоксия, модель доношенной беременности, сенсомоторное развитие, тревожность, крыса

DOI: 10.31857/S0869813921020023

Гипоксия плода или новорожденного является одной из основных причин неонатальной смертности, вызывает повреждения ЦНС и нарушает нормальное развитие мозга, что приводит к долговременным нарушениям моторных и когнитивных функций [1, 2]. Перинатальная гипоксия (ПГ) может приводить в дальнейшем к развитию детского церебрального паралича, синдрома дефицита внимания и гиперактивности, аутизма, эпилепсии и целого ряда когнитивных расстройств [2, 3]. Морфологические и функциональные нарушения, вызванные ПГ, зависят от степени доношенности ребенка [4–6]. ПГ регистрируется более чем у 60% недоношенных новорожденных и приводит к уменьшению объема полушарий мозга, увеличению желудочков и повреждениям белого вещества [6]. У доношенных ново-

рожденных ПГ отмечается реже (2–4 случая на 1000 новорожденных), но сопровождается высоким уровнем летальности [7]. При этой патологии наблюдаются повреждения как белого, так и серого вещества головного мозга [6]. Клинические исследования также свидетельствуют о зависимости последствий ПГ от пола ребенка. У мальчиков, перенесших гипоксию, выше уровень неонатальной смертности и более выражены отдаленные последствия ПГ по сравнению с девочками [5, 6]. Высокий уровень заболеваемости и тяжелые неврологические последствия определяют актуальность поиска эффективных стратегий профилактики и минимизации отдаленных эффектов гипоксии как у доношенных, так и недоношенных новорожденных с различной тяжестью повреждения мозга [8].

Последствия перинатальной гипоксии активно исследуются в экспериментах на животных, главным образом, на грызунах. При этом необходимо учитывать, что многие важнейшие этапы развития мозга у грызунов происходят в раннем постнатальном периоде. Анализ гистологического и функционального созревания мозга позволил сопоставить мозг крысы в течение первой недели жизни с мозгом недоношенного новорожденного, а в возрасте 10–12 дней – с мозгом доношенного новорожденного ребенка [9]. Для исследования эффектов ПГ на грызунах применяется ряд экспериментальных моделей. Наиболее широко используемой является модель Rice–Vannucci, разработанная в начале 1980-х годов. Эта модель гипоксии/ишемии включает в себя комбинацию односторонней перевязки общей сонной артерии у 7-дневного детеныша крысы с последующим помещением животного в условия пониженного содержания кислорода [10]. Уровень зрелости ЦНС 7-дневного детеныша крысы сопоставим с 32–34-недельным эмбрионом или с недоношенным новорожденным. Для моделирования гипоксии новорожденных с высокой степенью недоношенности грызунов подвергали гипоксии на 3-й постнатальный день (ПНД) [5]. Недостатком модели Rice–Vannucci является необходимость хирургического воздействия и наркоза, а также фокальный характер повреждения мозга [1]. Для моделирования ПГ у грызунов используют также гипоксическое воздействие без ишемии. Проведенные исследования свидетельствуют о наличии гистологических [11, 12], функциональных и поведенческих изменений у грызунов, вызванных однократным неонатальным гипоксическим воздействием [1, 13, 14]. Ранее нами было проведено исследование эффектов однократной нормобарической гипоксии (ОНГ, 8% O_2, 2 ч) на 2-й день жизни крыс и мышей как модели умеренного гипоксического повреждения мозга недоношенных новорожденных. Нами были выявлены зависимые от пола эффекты гипоксии на уровне транскрипционной активности генов, содержания нейротрофина и прооксидантного-антиоксидантного баланса, а также нарушения сенсомоторного развития, поведения и когнитивных функций у крыс и мышей, перенесших ОНГ на 2-й день жизни [15–17].

Целью представленной работы явилось изучение последствий однократной нормобарической гипоксии на 10-й день жизни крыс. Для оценки неврологических последствий такого воздействия было изучено влияние гипоксии на физическое и моторное развитие крыс, а также на уровень тревожности и исследовательское поведение животных в адолесцентый период. В работе были использованы самцы и самки крыс, что позволило выявить гендер-зависимый характер эффектов гипоксии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах линии Вистар обоего пола. Всего в работе было использовано 70 крыс из 7 выводков. Животных содержали в стандартных условиях вивария с соблюдением 12-часового светового режима и со свободным доступом к воде и пище. Условия содержания и экспериментальные процедуры одобрены Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 97ж от

30.10.2019). Исследование проведено с соблюдением биоэтических норм обращения с экспериментальными животными в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента от 22.09.2010.

День рождения крысят принимали за нулевой день жизни. На десятый постнатальный день (10 ПНД) животных взвешивали, маркировали, затем каждый выводок делили на 2 группы. Крыс одной группы (n = 38, 20 самцов и 18 самок) на 10-й ПНД изымали из гнезда и на 2 ч помещали в термостатируемую камеру (37°C), в которую подавали газовую смесь (8% O_2 и 92% N_2) (группа гипоксия). Остальных животных (n = 32, 15 самцов и 17 самок) не подвергали воздействию гипоксии, также изымали из гнезда и помещали в аналогичные условия при нормоксии (21% O_2) (группа контроль). Детеныши каждого выводка вместе с матерью содержались в отдельной клетке до достижения ими месячного возраста. Регистрировали массу тела животных и возраст открытия глаз. Анализировали изменения массы тела относительно исходных значений (10-й ПНД, до сеанса гипоксии).

Уровень психомоторного развития крыс оценивали при помощи стандартных тестов [18]. *Рефлекс отрицательного геотаксиса* – крысенка помещали на наклонную поверхность (45°) длиной 30 см головой в направлении склона. Регистрировали латентный период поворота, т.е. время, за которое животное поворачивается на 180°, а также время достижения верхнего края склона. Максимальное время наблюдения 120 с. Если в течение максимального периода наблюдения крыса не выполняла задачу, то это время принимали за время выполнения реакции. Выполнение рефлекса оценивали 2 раза – в возрасте 11 и 12 дней. *Рефлекс ползания* – крысенка помещали в центр окружности диаметром 13 см и регистрировали время, через которое животное всеми четырьмя лапами окажется вне круга. Максимальное время наблюдения составляло 120 с. Выполнение задачи оценивали 2 раза – в возрасте 11 и 13 дней. Уровень физической выносливости крысят оценивали в тесте *горизонтальный стержень* (с 18-го по 22-й ПНД ежедневно). При тестировании крысят помещали на неподвижный деревянный стержень диаметром 5 мм, укрепленный на высоте 20 см над поверхностью. Регистрировали время удержания на стержне. Для выявления нарушений равновесия и координации движений использовали тест *вращающийся стержень* (Rota Rod, Columbus Instrument, США). На 23-й ПНД животных адаптировали к установке. Для этого каждую крысу 3 раза с интервалом в 5 мин помещали на равномерно вращающийся (4 об/мин) горизонтальный цилиндр диаметром 7 см. Длительность каждой попытки не превышала 30 с. Регистрировали число животных, успешно выполнивших задачу (удержавшихся на стержне в течение 30 с). На следующий день крысу помещали на стержень, вращающийся с равномерным ускорением (исходная скорость вращения – 4 об/мин, ускорение – 0.2 об/мин с). Регистрировали время удержания на стержне. Максимальное время тестирования составляло 2 мин.

Оценку уровня двигательной и исследовательской активности проводили в тесте *Открытое поле* (ОП) в возрасте 30 ПНД. Экспериментальная установка (НПК Открытая Наука, Россия) представляет собой круглую арену (диаметр 97 см, высота стенок 42 см). Пол установки поделен на 19 сегментов двумя окружностями и шестью диаметрами. Эксперимент проводился в тишине и при красном освещении. Животное помещали в центр арены и в течение 2 мин регистрировали следующие показатели: длину пробега (количество пересеченных сегментов), число стоек (подъемов на задние лапы) и выходов в центр поля.

Оценку уровня тревожности на 31-й ПНД крыс проводили в тесте *Приподнятый крестообразный лабиринт* (ПКЛ). Экспериментальная камера лабиринта (НПК Открытая Наука, Россия) состояла из четырех расходящихся из центра рукавов (длина рукавов – 50 см, ширина – 15 см, высота стенок – 30 см). Два противоположных рукава были затемнены и закрыты стенками с торцов; два других – ярко освещены

и открыты. Лабиринт устанавливался на высоте 55 см от пола. Крысу помещали в центр лабиринта и в течение 3-х мин регистрировали время нахождения на открытых рукавах лабиринта, количество выходов на открытые и закрытые рукава, число стоек и свешиваний с открытых рукавов. Вычисляли процент времени, проведенного на открытых рукавах от общего времени тестирования, и процент выходов на открытые рукава от суммарного числа выходов.

При статистической обработке данных использовали пакет программ Statistica 10. Оценку нормальности распределения выборок проводили с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Распределение всех выборок соответствовало нормальному ($p > 0.20$), что позволило применить дисперсионный анализ (ANOVA). Использовали двухфакторный ANOVA для факторов *"гипоксия"* (нормоксия/гипоксия) и *"пол"* (самцы/самки). Для оценки динамических показателей (изменение массы тела и показатели сенсомоторного развития) применяли трехфакторный ANOVA (факторы *"гипоксия"* и *"пол"*) с повторными измерениями (фактор *"возраст"/"день тестирования"*). При отсутствии значимого эффекта фактора "*пол*" и значимого взаимодействия между факторами, сравнивали результаты, полученные на всей выборке крыс. В случае статистически значимого эффекта факторов или их взаимодействия для дальнейшей оценки различий между группами при post-hoc анализе использовали критерий Fisher LSD. Для сравнения долевых показателей (уровень летальности; процент крыс, удержавшихся на вращающемся стержне) был использован тест сравнения пропорций (differences between proportions). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные на рисунках и в таблице представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во время 2-часового гипоксического воздействия умерло 8 крысят (21.1% по всей выборке животных). В подгруппе самцов уровень летальности составил 28.6%, в подгруппе самок – 11.8%, однако статистически значимых отличий по этому показателю между самцами и самками зарегистрировано не было ($p = 0.23$, тест сравнения пропорций). У выживших животных наблюдался выраженный цианоз, о чем свидетельствовало посинение кожных покровов. В контрольной группе в ходе эксперимента выжили все крысы.

Оценка уровня физического и моторного развития

Не было выявлено статистически значимых отличий между группами животных по возрасту открытия глаз и исходной массе тела на 10-й ПНД (до сеанса гипоксии) (табл. 1). Трехфакторный ANOVA с повторными измерениями показал статистически значимое влияние фактора *"возраст"* ($F_{8,464} = 1059.6$; $p < 0.001$) на изменение массы тела крыс в течение периода регистрации (10–35-й ПНД). Не было зарегистрировано значимого влияния фактора *"пол"* ($F_{1,58} < 0.001$; $p > 0.98$), а также взаимодействие факторов *"возраст"* × *"пол"* ($F_{1,58} = 1.65$; $p = 0.12$), что позволило анализировать изменения массы тела по всей выборке животных (рис. 1). Применение трехфакторного ANOVA с повторными измерениями показало статистически значимое влияние фактора *"гипоксия"* на прирост массы тела крыс с 11-го до 15-го ПНД ($F_{1,58} = 7.80$; $p < 0.01$), при дальнейших измерениях (21–35-й ПНД) значимого влияния этого фактора ($F_{1,58} = 0.40$; $p = 0.55$) отмечено не было. Значимого взаимодействия факторов *"возраст"* х *"гипоксия"* зарегистрировано не было ($F_{4,232} = 0.40$; $p = 0.80$ и $F_{2,116} = 0.10$; $p = 0.91$, для возраста 11–15-й ПНД и 21–35-й ПНД соответственно). Последующий анализ показал значимое отставание по приросту массы тела в группе гипоксия с 11 по 15-й ПНД относительно контроля.

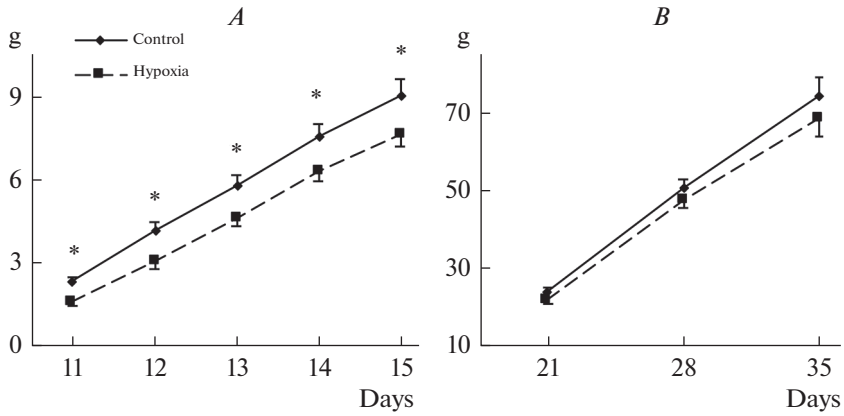

Рис. 1. Изменение массы тела крыс относительно исходных значений (10-й постнатальный день (ПНД), до сеанса гипоксии) с 11-го по 15-й ПНД (*A*) и с 21-го по 35-й ПНД (*B*) в группах контроль и гипоксия. По оси абсцисс – возраст крыс (дни), по оси ординат – изменение массы тела (g). Число крыс в группах: контроль – 32, гипоксия – 30. Значимые отличия от контроля отмечены * ($p < 0.05$).

Fig. 1. Changes of body weight relative to the baseline values (10 postnatal day (PND), before hypoxic exposure) from 11 to 15 PND (*A*) and from 21 to 35 PND (*B*) in the control and hypoxia groups. The X-axis – the age of rats (days), the Y-axis – weight gain (g). The number of rats in control group – 32, in hypoxia group – 30. Significant differences vs control marked * ($p < 0.05$).

Тест Рефлекс отрицательного геотаксиса. Анализ полученных результатов при помощи трехфакторного ANOVA с повторными измерениями не выявил значимого влияния фактора *“пол”*, а также значимого взаимодействия факторов *“пол”* × *“гипоксия”* для латентного периода поворота ($F_{1,58} = 0.52$; $p = 0.47$ и $F_{1,58} = 1.34$; $p = 0.25$

Таблица 1. Показатели физического развития и поведения крыс в тесте Открытое поле в группах контроль и гипоксия

Table 1. The parameters of physical development and behaviour of rats in the Open field test in the control and hypoxia groups

Показатели Parameters	Контроль Control ($n = 32$)	Гипоксия Hypoxia ($n = 30$)	Результаты 2-х факторного ANOVA 2-way ANOVA results		
			фактор *“гипоксия”* factor “*hypoxia*” $F_{1,58}$ (p)	фактор *“пол”* factor “*sex*” $F_{1,58}$ (p)	*“гипоксия”* × *“пол”* *“hypoxia”* × *“sex”* $F_{1,58}$ (p)
Масса тела до гипоксии (10 ПНД, г) (Body weight before hypoxia, 10 PND, g)	17.7 ± 0.4	17.2 ± 0.4	$F = 0.28$ (0.60)	$F = 0.80$ (0.38)	$F = 0.06$ (0.81)
Возраст открытия глаз (дни) Age of eye opening, day	14.9 ± 0.2	15.1 ± 0.2	$F = 0.52$ (0.48)	$F = 0.01$ (0.93)	$F = 0.21$ (0.65)
	Тест Открытое поле (Open Field test)				
Число пересеченных сегментов The number of segment crosses	44.8 ± 3.0	42.0 ± 2.6	$F = 0.50$ (0.49)	$F = 0.61$ (0.44)	$F = 0.66$ (0.42)
Число стоек The number of rears	8.2 ± 0.8	7.8 ± 1.0	$F = 0.10$ (0.76)	$F = 0.04$ (0.85)	$F = 0.42$ (0.52)
Число выходов в центр арены The number of entries into arena center	3.2 ± 0.4	3.2 ± 0.3	$F = 0.02$ (0.92)	$F = 0.001$ (0.96)	$F = 0.01$ (0.94)

Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего.
The results are expressed as the mean ± SEM.

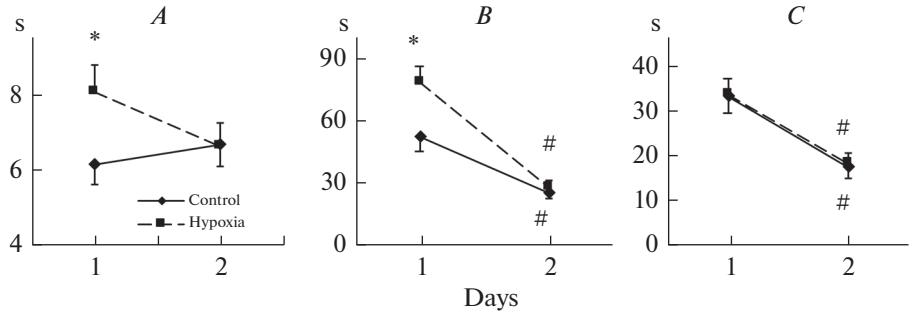

Рис. 2. Показатели становления моторных рефлексов в группах контроль и гипоксия. По оси абсцисс – дни тестирования, по оси ординат: *A* – латентный период поворота (s) и *B* – время достижения верхнего края склона (s) в тесте рефлекс отрицательного геотаксиса, *C* – время выполнения задачи в тесте рефлекс ползания (s). Число крыс в группах: контроль – 32, гипоксия – 30. Значимые отличия от контроля отмечены * ($p < 0.05$); от соответствующего показателя при первом тестировании – # ($p < 0.05$).

Fig. 2. Parameters of motor reflexes maturation in the control and hypoxia groups. The X- axis – testing days, the Y-axis: *A* – latency to turn around (s) and *B* – time of reaching the top of the slope (s) in the test Negative Geotaxis, *C* – time for task performance in the Gait Reflex test (s). The number of rats in control group – 32, in hypoxia group – 30. Significant differences vs control marked * ($p < 0.05$), differences vs corresponding value at the first testing – # ($p < 0.05$).

соответственно) и времени достижения верхнего края склона ($F_{1,58} = 0.39$; $p = 0.54$ и $F_{1,58} = 0.89$; $p = 0.35$ соответственно). Это позволило представить данные, полученные по всей выборке животных. Для показателя латентного периода поворота ANOVA не выявил значимого влияния факторов *“гипоксия”* и *“день тестирования”* ($F_{1,58} = 1.70$; $p = 0.20$ и $F_{1,58} = 0.91$; $p = 0.35$), однако было зарегистрировано статистически значимое взаимодействие этих факторов ($F_{1,58} = 4.01$; $p < 0.05$).

Последующий анализ показал значимое увеличение латентного периода поворота в группе гипоксия по сравнению с контролем при первом тестировании (11-й ПНД) (рис. 2*A*). Для времени достижения края склона ANOVA показал статистически значимое влияние факторов *“гипоксия”* и *“день тестирования”* ($F_{1,58} = 5.67$; $p = 0.02$ и $F_{1,58} = 43.08$; $p < 0.0001$ соответственно), а также взаимодействие этих факторов ($F_{1,58} = 4.13$; $p < 0.05$). Последующий анализ выявил значимое превышение времени достижения края склона при первом тестировании (11-й ПНД) в группе гипоксия по сравнению с группой контроль. При повторном тестировании в обеих группах величина показателя была значимо ниже, чем на 11-й ПНД (рис. 2*B*).

Тест Рефлекс ползания. Анализ полученных результатов при помощи трехфакторного ANOVA с повторными измерениями не выявил значимого влияния фактора *“пол”*, также значимого взаимодействия факторов *“пол”* × *“гипоксия”* для времени выполнения задачи ($F_{1,58} = 2.31$; $p = 0.18$ и $F_{1,58} = 0.70$; $p = 0.41$ соответственно), что позволило представить данные, полученные по всей выборке животных. Также не было зарегистрировано влияния фактора *“гипоксия”* и взаимодействия факторов *“гипоксия”* × *“день тестирования”*. Отмечалось статистически значимое влияние фактора *“день тестирования”* ($F_{1,58} = 23.24$; $p < 0.001$). Post hoc анализ показал значимое снижение времени выполнения задачи при повторном тестировании относительно соответствующих значений на 11-й ПНД в обеих группах (рис. 2*C*).

Тест Горизонтальный стержень. Трехфакторный ANOVA с повторными измерениями не выявил значимого влияния фактора *“гипоксия”* ($F_{1,58} = 0.19$; $p = 0.67$), а также взаимодействия факторов *“гипоксия”* × *“пол”* ($F_{1,58} = 0.01$; $p = 0.94$) и *“гипо-*

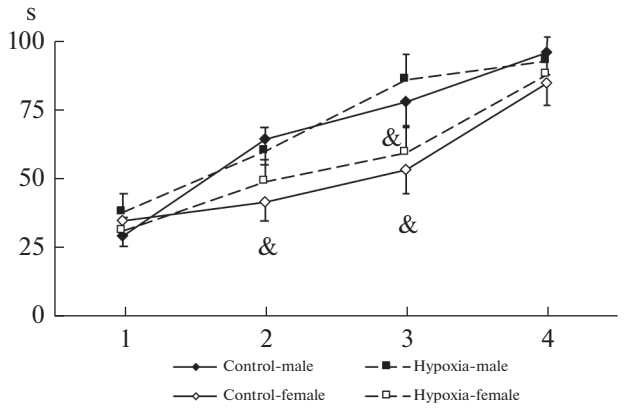

Рис. 3. Изменение времени удержания на неподвижном горизонтальном стержне у самцов и самок крыс в группах контроль и гипоксия. По оси абсцисс – дни тестирования, по оси ординат – время удержания (s). Число самцов/самок крыс в группах: контроль – 15/17, гипоксия – 14/16. Значимые отличия от соответствующей подгруппы самцов отмечены & ($p < 0.05$).

Fig. 3. Changes of the holding time on the fixed horizontal rod in the male and female rats from the control and hypoxia groups. The X-axis – testing days, the Y-axis – the holding time (s). The number of male/female rats in the control group – 15/17, in hypoxia group – 14/16. Significant differences vs corresponding male subgroup marked & ($p < 0.05$).

ксия" × *"день тестирования"* ($F_{3,174} = 0.34$; $p = 0.80$) для времени удержания на стержне. Отмечалось статистически значимое влияние факторов *"пол"* ($F_{1,58} = 4.08$; $p < 0.05$) и *"день тестирования"* ($F_{3,174} = 83.85$; $p < 0.001$), а также взаимодействие этих факторов ($F_{3,174} = 4.13$; $p < 0.01$). Дальнейший анализ показал, что во всех группах в ходе тестирования значимо увеличивалось время удержания на стержне ($p < 0.01$ относительно показателя при первом тестировании). В подгруппах самок при втором и третьем тестировании время удержания на стержне было статистически значимо меньше, чем в подгруппах самцов (рис. 3).

Тест вращающийся стержень. В первый день тестирования животных помещали на равномерно вращающийся стержень 3 раза. В ходе адаптации к установке доля крыс, успешно справившихся с задачей, увеличивалась во всех группах (рис. 4*A*). Однако при первых двух попытках величина этого показателя в группе крыс, перенесших гипоксию, была статистически значимо меньше, чем в контроле ($p < 0.04$, тест сравнения пропорций).

Оценка способности крыс удерживаться на стержне, вращающемся с ускорением, не выявила значимого влияния факторов *"гипоксия"* ($F_{1,58} = 0.85$; $p = 0.36$) и *"пол"* ($F_{1,58} = 0.18$; $p = 0.67$) на время удержания, однако было зарегистрировано взаимодействие этих факторов на уровне тенденции ($F_{1,58} = 3.79$; $p < 0.06$). Дальнейший анализ показал, что время удержания на стержне в подгруппе самцов, перенесших гипоксию, статистически значимо меньше, чем в подгруппе контрольных самцов. В подгруппе самок отличий по этому показателю отмечено не было (рис. 4*B*).

Оценка поведения крыс

Тест открытое поле. В возрасте 30 ПНД оценивали поведение крыс в этом тесте. Двухфакторный ANOVA не выявил значимого влияния факторов *"гипоксия"* и

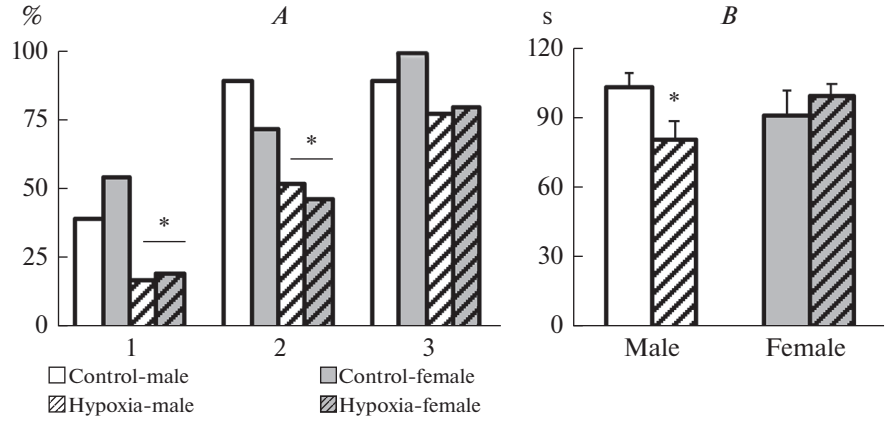

Рис. 4. Показатели самцов и самок крыс в группах контроль и гипоксия в тесте вращающегося стержня (Rota Rod). *A*: по оси абсцисс – номер попытки, по оси ординат – процент крыс, удержавшихся на равномерно вращающемся стержне не менее 30 с. *B* – время удержания на стержне, вращающемся с ускорением (s). Число самцов/самок крыс в группах: контроль – 15/17, гипоксия – 14/16. Значимые отличия от соответствующего контроля отмечены * ($p < 0.05$).

Fig. 4. The parameters of the male and female rats from the control and hypoxia groups in the Rota Rod test. *A*: the X-axis – the trial number, the Y-axis – the percentage of rats which hold on the rod revolving with constant speeds for more than 30 s. *B*: the Y-axis – the latency to fall from rod rotating with increasing speed (s). The number of male/female rats in the control group – 15/17, in hypoxia group – 14/16. Significant differences vs corresponding control marked * ($p < 0.05$).

"пол", а также взаимодействия этих факторов для следующих показателей: величина пробега, число стоек и выходов в центр арены (табл. 1).

Тест приподнятый крестообразный лабиринт. В возрасте 31-го ПНД оценивали уровень тревожности крыс в тесте ПКЛ. Применение двухфакторного ANOVA показало значимое влияние фактора *"гипоксия"* ($F_{1,55} = 4.41$; $p = 0.04$), а также взаимодействие факторов *"гипоксия"* × *"пол"* на уровне тенденции ($F_{1,55} = 3.57$; $p < 0.06$) для количества свешиваний с открытых рукавов лабиринта. Значимого влияния фактора *"пол"* на величину этого показателя отмечено не было ($F_{1,55} = 1.07$; $p = 0.31$). Для времени, проведенного на открытых рукавах лабиринта, отмечалось влияние факторов *"гипоксия"* и *"пол"* на уровне тенденции ($F_{1,55} = 3.56$; $p < 0.07$ и $F_{1,55} = 3.20$; $p < 0.08$ соответственно), взаимодействия этих факторов не наблюдалось ($F_{1,55} = 2.10$; $p = 0.15$). Для остальных показателей поведения в ПКЛ (выходы на открытые рукава лабиринта, число стоек и суммарное число выходов на рукава) не было выявлено значимого влияния факторов *"гипоксия"* и *"пол"*, а также взаимодействия этих факторов ($F_{1,55} < 2.00$; $p > 0.17$). Дальнейший анализ показал статистически значимое снижение числа свешиваний и процента времени, проведенного на открытых рукавах лабиринта, в подгруппе самок, перенесших гипоксию, по сравнению с контрольными самками. В подгруппе самцов значимых отличий параметров поведения в ПКЛ между опытом и контролем отмечено не было. Однако число свешиваний и процент времени, проведенного на открытых рукавах лабиринта, в подгруппе контрольных самок статистически значимо превышали соответствующие показатели в подгруппе контрольных самцов (рис. 5).

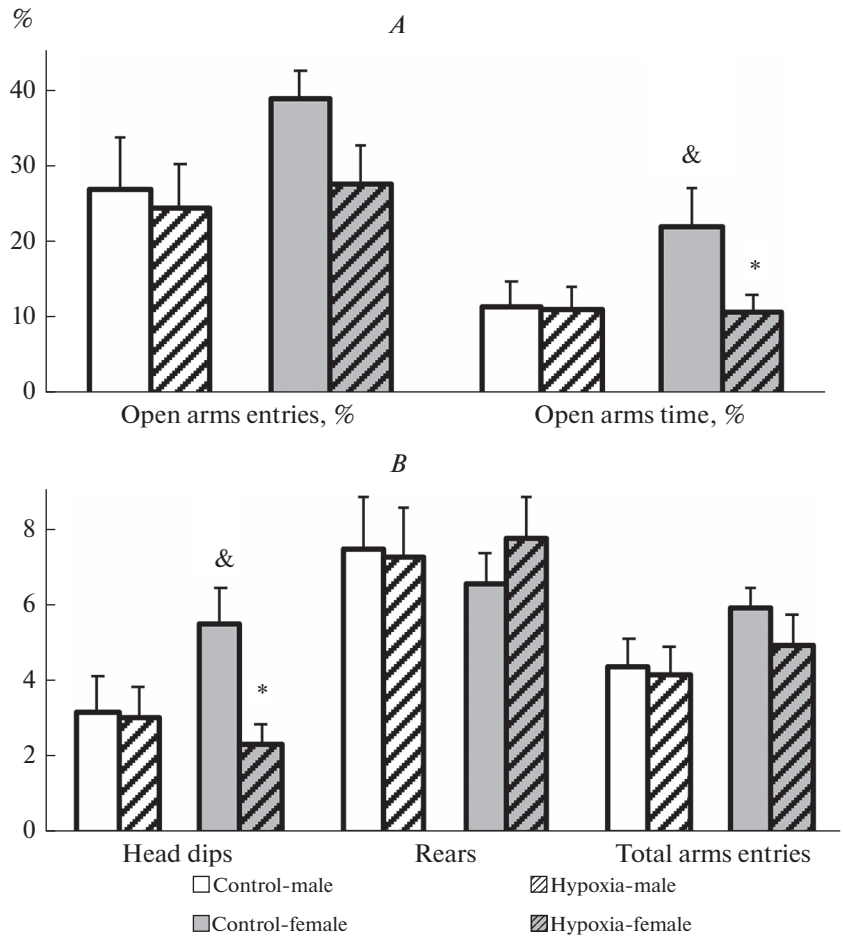

Рис. 5. Параметры поведения самцов и самок крыс в группах контроль и гипоксия в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт. *A* – процент выходов на открытые рукава и процент времени, проведенного на открытых рукавах; *B* – число свешиваний, стоек и суммарное число выходов на рукава. Число самцов/самок крыс в группах: контроль – 15/17, гипоксия – 14/16. Значимые отличия от соответствующего контроля отмечены * ($p < 0.05$), от соответствующей подгруппы самцов – &.

Fig. 5. Behavioural parameters of the male and female rats from the control and hypoxia groups in the Elevated Plus Maze test. *A* – the percentage of the number of open arm entries and the percentage of the time spent in the open arms; *B* – head dipping, rearing and total arms entries. The number of male/female rats in the control group – 15/17, in hypoxia group – 14/16. Significant differences vs corresponding control marked * ($p < 0.05$), differences vs corresponding male subgroup marked & ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для изучения механизмов негативных эффектов перинатальной гипоксии и поиска способов их ослабления и предотвращения необходимы адекватные модели на животных. В представленной работе была использована модифицированная модель неонатальной гипоксии без ишемии (8% O_2 в течение 2 ч) на крысах в возрасте 10 дней. По уровню зрелости мозг крысы в возрасте 10–12 дней сопоставим с мозгом доношенного новорожденного ребенка [9]. Поэтому использованную нами

модель можно рассматривать в качестве модели острой гипоксии доношенных новорожденных [19, 20]. Ранее нами было проведено изучение острых и отставленных эффектов аналогичного воздействия на крыс и мышей в возрасте 2-го ПНД, модели гипоксии новорожденных с высокой степенью недоношенности [15–17].

В настоящей работе была зарегистрирована значительная неонатальная смертность крыс (21.1%). При этом уровень летальности в подгруппе самцов в 2.4 раза превышал соответствующий показатель в группе самок. Однако это отличие не было статистически значимым, что, вероятно, связано с недостаточной величиной выборки. Летальность при гипоксии на 10-й ПНД значительно превышала зарегистрированную нами ранее в модели ОНГ на 2-й день жизни крыс (от 4.5 до 10% в различных сериях экспериментов) [15, 16].

Согласно клиническим данным, перинатальная гипоксия является одной из основных причин перинатальной смертности [2, 14]. При гипоксии у доношенных новорожденных наблюдается более высокий уровень летальности, чем у недоношенных [6]. Показано, что уровень неонатальной смертности выше у мальчиков, перенесших перинатальную гипоксию, чем у девочек после аналогичного воздействия [5, 6].

Для оценки влияния ОНГ на 10-й день жизни на физическое развитие крысят регистрировали изменения массы тела, возраст открытия глаз и изучали становление моторных рефлексов. Одним из показателей уровня развития крыс является возраст открытия глаз. Оценка этого параметра в данном исследовании не выявила достоверных различий между группами животных. Ранее нами не было зарегистрировано изменения возраста открытия глаз у крыс и мышей, перенесших ОНГ на 2-й день жизни [15–17]. Большинство исследований эффектов перинатальной гипоксии также не выявило изменения этого показателя у самцов и самок грызунов в различных моделях острой гипоксии или гипоксии/ишемии [21, 22].

Нами было зарегистрировано замедление прироста массы тела в течение 5 дней после ОНГ у крыс обоего пола. Сравнение с эффектами ОНГ на 2-й день жизни крыс показало, что характер изменений массы тела определялся возрастом гипоксического воздействия. ОНГ на ранних стадиях развития приводила к замедлению прироста массы тела у самок, но не у самцов крыс в течение 2-х недель после воздействия [15].

Показателем развития потомства грызунов также является скорость созревания сенсорно-моторных рефлексов в период вскармливания. В данной работе было зарегистрировано нарушение выполнения рефлекса отрицательного геотаксиса на 11-й ПНД у самцов и самок крыс, перенесших гипоксию. Увеличение времени выполнения этого рефлекса указывает на нарушение взаимосвязи между экстероцептивными стимулами и локомоторным ответом [14]. Влияния на выполнение рефлекса ползания отмечено не было, что свидетельствует об отсутствии воздействия этого фактора на двигательную активность. Ранее нами было показано нарушение выполнения рефлекса переворота на плоскости (6-й ПНД) и отрицательного геотаксиса (12-й ПНД) у крыс, подвергавшихся ОНГ на 2-й день жизни; влияния на выполнение рефлекса ползания не наблюдалось [15, 16]. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Замедление становления ранних моторных рефлексов таких, как рефлекс переворота и отрицательного геотаксиса зарегистрировано в различных моделях неонатальной гипоксии и гипоксии/ишемии [14, 22–24], при этом влияния на выполнение рефлекса ползания отмечено не было [22, 25]. Показано, что нарушения становления ранних рефлексов у грызунов коррелируют с долговременным функциональным и когнитивным дефицитом [23]. Согласно клиническим данным, у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, нарушения ранних рефлексов (таких как рефлекс Моро, подошвенный,

хватательный, сосательный рефлексы) являются высокопредиктивными для дальнейшего развития церебрального паралича и задержки умственного развития [24].

Для оценки влияния неонатальной гипоксии на физическую выносливость и координацию движений регистрировали время удержания на неподвижном и вращающемся стержнях. В случае неподвижного стержня в ходе 4-дневного тестирования (18–21-й ПНД) у крыс обеих групп время удержания увеличивалось, что свидетельствует об обучении моторной задаче. У самок возрастание этого показателя происходило медленнее, чем у самцов, но при последнем предъявлении значимых отличий между самцами и самками не наблюдалось. Нами не было выявлено изменения времени удержания на неподвижном стержне у крыс, перенесших гипоксию, что свидетельствует об отсутствии влияния на физическую выносливость. Ранее было исследовано влияние неонатальной гипоксии/ишемии (4-й ПНД) на способность к удержанию на горизонтальном стержне [26]. В работе было зарегистрировано снижение времени удержания на стержне у крыс с 5-го по 16-й ПНД, однако при дальнейших измерениях (17–21-й ПНД) отличий от контроля не наблюдалось, что согласуется с полученными нами данными. При оценке координации движений (тест Rota Rod) наблюдалось нарушение способности удерживаться на вращающемся стержне у крыс, перенесших гипоксию. Такое нарушение отмечалось как в случае равномерного вращения стержня, так и при вращении с ускорением. В первом случае эффект не зависел от пола животных, а во втором – нарушения наблюдались только в подгруппе самцов, перенесших гипоксию. Негативное влияние гипоксии на координацию движений в тесте Rota Rod отмечалось в модели гипоксии/ишемии у 7-дневных крыс, однако аналогичное воздействие у крыс 3-дневного возраста не влияло на выполнение задачи в этом тесте [4]. В модели неонатальной гипоксии без ишемии способность крыс к удержанию на вращающемся стержне ранее не исследовалась. Показано, что у животных наибольшие морфологические изменения, вызванные перинатальной гипоксией, наблюдались в зонах мозга, контролирующих движение, таких как кора, базальные ганглии, гиппокамп, мозжечок [27]. Такие изменения могут лежать в основе зарегистрированных нами нарушений моторных функций у крыс, перенесших ОНГ на 10-й день жизни. Клинические данные подтверждают связь повреждения базальных ганглиев и таламических структур у доношенных новорожденных, перенесших гипоксию, с моторными нарушениями, регистрируемыми в возрасте 7 лет [28].

Влияние ОНГ на исследовательское поведение и уровень тревожности животных изучали у крыс адолесцентного возраста. Оценка поведения крыс в тесте ОП на 30-й день жизни не выявила отличий между крысами, перенесшими гипоксию, и контролем. Ранее нами было показано увеличение двигательной активности в этом тесте у 30-дневных крыс, перенесших ОНГ на 2-й день жизни, что свидетельствовало о гиперактивности при помещении в новые условия [16]. Другими исследователями также отмечалась гиперактивность в ОП у крыс и мышей, перенесших гипоксию в 1–2-е дни жизни [14, 29]. Влияние ОНГ на 10-й день жизни крыс на поведение в ОП ранее не исследовалось. У взрослых крыс, перенесших гипоксию/ишемию на 7-й день жизни, отмечалась повышенная двигательная активность в тесте ОП [30, 31], однако в адолесцентном возрасте (3 недели) у животных, перенесших аналогичное воздействие, изменений поведения в ОП зарегистрировано не было [23]. Вероятно, эффекты неонатальной гипоксии на поведение в ОП определяются возрастом гипоксического воздействия и возрастом тестирования поведения грызунов.

В тесте ПКЛ нами было зарегистрировано снижение числа свешиваний и процента времени, проведенного на открытых рукавах лабиринта, в подгруппе самок, перенесших гипоксию, по сравнению с контрольными самками. При этом показатели, связанные с двигательной и исследовательской активностью (число стоек и

суммарное число выходов на рукава), не изменялись. Полученные нами данные свидетельствуют о повышенном уровне тревожности у самок, перенесших гипоксию, по сравнению с контрольными самками. В подгруппе самцов, перенесших ОНГ, нами не было зарегистрировано изменения показателей тревожности и исследовательской активности относительно контроля, однако следует отметить более высокий уровень тревожности у контрольных самцов по сравнению с самками. Аналогичные половые отличия в поведении крыс в тесте ПКЛ были зарегистрированы ранее [32]. Вызванное гипоксией увеличение тревожности в ПКЛ может проявляться у самок на фоне невысокой фоновой тревожности, но не в случае самцов, исходная тревожность которых была достаточно высокой. Данные по влиянию перинатальной гипоксии на уровень тревожности грызунов крайне противоречивы. В модели гипоксии/ишемии (7-й ПНД) было показано увеличение тревожности у взрослых животных, при этом зависимости от пола отмечено не было [31]. В моделях перинатальной и неонатальной асфиксии (0–1-й ПНД) отмечалось как увеличение тревожности в ПКЛ у взрослых самцов крыс, перенесших гипоксию/ишемию [13, 33], так и отсутствие влияния такого воздействия на уровень тревожности в этом тесте [34]. Самки в этих исследованиях использованы не были. У животных, перенесших неонатальную гипоксию без ишемии на 10-й день жизни, поведение в ПКЛ ранее не исследовалось. Противоречивые результаты, полученные при изучении влияния перинатальной гипоксии на уровень тревожности животных, могут быть связаны с различиями в экспериментальных моделях гипоксии, разными сроками и условиями тестирования тревожности.

Проведенные нами исследования показали, что влияние неонатальной гипоксии на координацию движений и уровень тревожности зависит от пола животных. Результаты клинических исследований свидетельствуют о гендер-зависимом характере острых и отставленных эффектов перинатальной гипоксии [5, 6]. Однако в экспериментах на животных этот вопрос недостаточно изучен, существующие в литературе данные противоречивы, что определяется недостаточным количеством исследований, в которых учитывался пол животных [35].

Согласно клиническим данным, дети, перенесшие перинатальную гипоксию, характеризуются нарушением двигательных функций, сниженной способностью к обучению, невнимательностью, гиперактивностью, повышенной тревожностью и другими когнитивными нарушениями [2, 5]. Результаты, полученные в экспериментах на животных, также свидетельствуют о негативных эффектах перинатальной гипоксии [1–3, 14].

Вопрос о разработке адекватных моделей перинатальной гипоксии для дальнейшего изучения эффектов и поиска путей коррекции ее последствий до настоящего времени остается не решенным. Большинство биохимических и патофизиологических данных, связанных с последствиями перинатальной гипоксии у грызунов, получены с использованием модели гипоксии–ишемии Rice–Vannucci [1, 5, 10]. Гипоксии/ишемии подвергали животных в возрасте от 3-х до 7-ми дней [30, 35], что можно рассматривать как модель гипоксии новорожденных различной степени недоношенности [36, 37]. Неинвазивные модели гипоксии без ишемии используются реже, чем модель Rice–Vannucci, хотя их преимуществом является отсутствие травмирующего эффекта хирургической операции и наркоза. В моделях перинатальной [38] и неонатальной [13] асфиксии гипоксическому воздействию подвергаются животные в день родов или на 1–2-й постнатальный день, что соответствует новорожденным с высокой степенью недоношенности. Гипоксическое воздействие у крыс в 10-дневном возрасте было использовано для моделирования эпилепсии, при этом в ходе воздействия содержание кислорода в камере постепенно снижали с 7 до 1% в течение 15–25 мин до появления апноэ [39, 40]. В данной работе были исследованы изменения физического развития и поведения у крыс, перенесших

однократную нормобарическую гипоксию (8% O_2 в течение 2 ч) в возрасте 10-ти дней, когда по уровню созревания мозг крысы сопоставим с мозгом доношенного новорожденного [9]. Было показано, что использованное воздействие приводит к замедлению физического и моторного развития животных, нарушению координации движений и увеличению тревожности у крыс аделесцентного возраста. Полученные с применением данной модели результаты согласуются с клиническими данными [2, 5]. Использованную методику можно рассматривать в качестве модели для исследования последствий острой гипоксии доношенных новорожденных.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 19-0400209 и № 19-34-90152).

ВКЛАД АВТОРОВ

Д.Д. Хухарева – методология, проведение экспериментов, обработка данных, написание статьи; Ю.А. Суханова – методология, проведение экспериментов; Е.А. Себенцова – планирование и проведение экспериментов, обработка данных; Н.Г. Левицкая – планирование экспериментов, обработка данных, написание и редактирование статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Millar L.J., Shi L., Hoerder-Suabedissen A., Molnár Z.* Neonatal hypoxia ischaemia: mechanisms, models, and therapeutic challenges. Front. Cell. Neurosci. 11: 1–36. 2017. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078
2. *Piesova M., Mach M.* Impact of perinatal hypoxia on the developing brain. Physiol. Res. 69: 199–213. 2020. https://doi.org/10.33549/physiolres.934198
3. *Sukhanova I.A., Sebentsova E.A., Levitskaya N.G.* The acute and delayed effects of perinatal hypoxic brain damage in children and in model experiments with rodents. Neurochem. J. 10(4): 258–272. 2016. https://doi.org/10.1134/S1819712416040127
4. *Alexander M., Garbus H., Smith A.L.L., Rosenkrantz T.S.S., Fitch R.H.H.* Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. Behav. Brain Res. 259: 85–96. 2014. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.038
5. *Smith A., Alexander M., Rosenkrantz T., Sadek M., Fitch R.* Sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia: insights from a clinical meta-analysis and a rodent model of induced hypoxic ischemic brain injury. Exp. Neurol. 254: 54–67. 2014. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.003
6. *Cohen S.S., Stonestreet B.S.* Sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia: insights from a clinical meta-analysis and a rodent model of induced hypoxic ischemic injury. Exp. Neurol. 256: 70–73. 2014. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.03.018
7. *Delcour M., Russier M., Amin M., Baud O., Paban V., Barbe M.F., Coq J.O.* Impact of prenatal ischemia on behavior, cognitive abilities and neuroanatomy in adult rats with white matter damage. Behav. Brain Res. 232(1): 233–244. 2012. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.029
8. *Lee B.S., Jung E., Lee Y., Chung S.-H.* Hypothermia decreased the expression of heat shock proteins in neonatal rat model of hypoxic ischemic encephalopathy. Cell Stress Chaperones. 22(3): 409–415. 2017. https://doi.org/10.1007/s12192-017-0782-0
9. *Jantzie L., Robinson S.* Preclinical models of encephalopathy of prematurity. Dev. Neurosci. 37 (4): 277–288. 2015. https://doi.org/10.1159/000371721
10. *Rice J.E., Vannucci R.C., Brierley J.B.* The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Ann. Neurol. 9(2): 131–141. 1981. https://doi.org/10.1002/ana.410090206
11. *Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ватаева Л.А., Шишко Т.Т.* Отдаленные последствия воздействия гипоксии в перинатальный период развития на структурно-функциональные ха-

рактеристики мозга у крыс. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 97(10): 1092–1100. 2011. [*Otellin V.A., Khozha? L.I., Vataeva L.A., Shishko T.T.* The remote consequences of hypoxia influence in perinatal development period on structurally functional characteristics of the rat brain. Russ. J. Physiol. 97(10): 1092–1100. 2011. (In Russ)].

12. *Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ватаева Л.А.* Влияние гипоксии в раннем перинатальном онтогенезе на поведение и структурные характеристики головного мозга крыс. Журн. эволюц. биохим. физиол. 48(5): 467–472. 2012. [*Otellin V.A., Khozhaj L.I., Vataeva L.A.* Effect of hypoxia in early perinatal ontogenesis on behavior and structural characteristics of the rat brain. Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 48(5): 467–473. 2012. (In Russ)].
13. *Takada S., Motta-Teixeira L., Machado-Nils A., Lee V., Sampaio C., Polli R., Malheiros J., Takase L., Kihara A., Covolan L., Xavier G., Nogueira M.* Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. Behav. Brain Res. 296: 331–338. 2016. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.039
14. *Wang Z., Zhan J., Wang X., Gu J., Xie K., Zhang Q., Liu D.* Sodium hydrosulfide prevents hypoxia-induced behavioral impairment in neonatal mice. Brain Res. 1538: 126–134. 2013. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.09.043
15. *Sukhanova I.A., Sebentsova E.A., Khukhareva D.D., Manchenko D.M., Glazova N.Y., Vishnyakova P.A., Inozemtseva L.S., Dolotov O.V., Vysokikh M.Y., Levitskaya N.G.* Gender-dependent changes in physical development, BDNF content and GSH redox system in a model of acute neonatal hypoxia in rats. Behav. Brain Res. 350: 87–98. 2018. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.008
16. *Sukhanova I.A., Sebentsova E.A., Khukhareva D.D., Vysokikh M.Y., Bezuglov V.V., Bobrov M Y., Levitskaya N.G.* Early-life N-arachidonoyl-dopamine exposure increases antioxidant capacity of the brain tissues and reduces functional deficits after neonatal hypoxia in rats. Int. J. Dev. Neurosci. 78: 7–18. 2019. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.06.007
17. *Хухарева Д.Д., Гусева К.Д., Суханова Ю.А., Себенцова Е.А. Левицкая Н.Г.* Физиологические эффекты острой неонатальной нормобарической гипоксии у мышей линии C57Dl/6. Журнал высш. нерв. деятельн. им. И.П. Павлова. 70(4): 515–527. 2020. [*Khukhareva D.D., Guseva K.D., Sukhanova Iu. A., Sebentsova E.A., Levitskaya N.G.* Physiological effects of acute neonatal normobaric hypoxia in C57Bl/6 mice. Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im. I.P. Pavlova. 70(4): 515–527. 2020. (In Russ)]. https://doi.org/10.31857/S0044467720040048
18. *Altman J., Sudarshan K.* Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav. 23: 896–920. 1975. https://doi.org/10.1016/0003-3472(75)90114-1
19. *Brazel C.Y., Rosti R.T., Boyce S., Rothstein R.P., Levison S.W.* Perinatal hypoxia/ischemia damages and depletes progenitors from the mouse subventricular zone. Dev. Neurosci. 26(2-4): 266–274. 2004. https://doi.org/10.1159/000082143
20. *Coq J.-O., Delcour M., Massicotte V.S., Baud O., Barbe M.F.* Prenatal ischemia deteriorates white matter, brain organization, and function: implications for prematurity and cerebral palsy. Dev. Med. Child Neurol. 58: 7–11. 2016. https://doi.org/10.1111/dmcn.13040
21. *Kletkiewicz H., Nowakowska A., Siejka A., Mila-Kierzenkowska C., Woźniak A., Caputa M., Rogalska J.* Deferoxamine improves antioxidative protection in the brain of neonatal rats: The role of anoxia and body temperature. Neurosci. Lett. 628: 116–122. 2016. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.022
22. *Peterson B., Won S., Geddes R., Sayeed I., Stein D.* Sex-related differences in effects of progesterone following neonatal hypoxic brain injury. Behav. Brain Res. 286: 152–165. 2015. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.005
23. *Lubics A., Reglodi D., Tamas A., Kiss P., Szalai M., Szalontay L., Lengvári I.* Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. Behav. Brain Res. 157(1): 157–165. 2005. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.019
24. *Ten V., Bradley-Moore M., Gingrich J., Stark R., Pinsky D.* Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. Behav. Brain Res. 145(1–2): 209–219. 2003. https://doi.org/10.1016/s0166-4328(03)00146-3
25. *Huang H., Wen X., Liu H.* Sex differences in brain MRI abnormalities and neurodevelopmental outcomes in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. Int. J. Neurosci. 126(7): 647–657. 2016. https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1047016
26. *Fan L., Lin S., Pang Y., Lei M., Zhang F., Rhodes P., Cai Z.* Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. Behav. Brain Res. 165(1): 80–90. 2005. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.033

27. *Журавин И.А., Дубровская Н.М., Туманова Н.Л.* Постнатальное физиологическое развитие крыс после острой пренатальной гипоксии Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 89(5): 522–532. 2003. [*Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L.* Postnatal physiological development of rats after acute prenatal hypoxia. Russ. J. Physiol. 85(5): 522–532. 2003. (In Russ)].

28. *Mercure E., Barnett A.L.* Neonatal brain MNRI and motor outcome at school age in children with neonatal encephalopathy: a review of personal experience. Neural Plasticity. 10(1–2): 51–57. 2003.
https://doi.org/10.1155/NP.2003.51

29. *Ордян Н.Э., Акулова В.К., Пивина С.Г., Отеллин В.А., Тюренков И.Н.* Нарушения вследствие перинатальной гипоксии поведенческой и гормональной стресс-реакций крыс адолесцентного возраста и их коррекция новым производным ГАМК. Журн. эволюц. биохим. физиол. 55(1): 59–64. 2019. [*Ordyan N.E., Akulova V.K., Pivina S.G., Otellin V.A., Tyurenkov I.N.* Perinatal hypoxia-induced impairments of behavioral and hormonal stress responses in rats and their correction by a novel GABA derivative. Zh. Evol. Biokhem. Fiziol. 55(1): 59–64. 2019. (In Russ)].
https://doi.org/10.1134/S0044452919010091

30. *Confortim H.D., Deniz B.F., de Almeida W., Miguel P.M., Bronauth L., Vieira M.C., de Oliveira B.C., Pereira L.O.* Neonatal hypoxia-ischemia caused mild motor dysfunction, recovered by acrobatic training, without affecting morphological structures involved in motor control in rats. Brain Res. 1707: 27–44. 2019.
https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.11.021

31. *Markostamou I., Ioannidis A., Dandi E., Mandyla M.A., Nousiopoulou E., Simeonidou C., Spandou E., Tata D.A.* Maternal separation prior to neonatal hypoxia-ischemia: Impact on emotional aspects of behavior and markers of synaptic plasticity in hippocampus. Int. J. Dev. Neurosci. 52: 1–12. 2016.
https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.04.002

32. *Johnston A.L., Files S.E.* Sex differences in animal tests of anxiety. Physiol. Behav. 49: 245–250. 1991.
https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90039-q

33. *Morales P., Simola N., Bustamante D., Lisboa F., Fiedler J., Gebicke-Haerter P.J., Morelli M., Tasker R.A., Herrera-Marschitz M.* Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on apoptosis, non-spatial working memory and anxiety in rats. Exp. Brain Res. 202: 1–14. 2010.
https://doi.org/10.1007/s00221-009-2103-z

34. *Galeano P., Blanco Calvo E., Madureira de Oliveira D., Cuenya L., Kamenetzky G.V., Mustaca A.E., Barreto G.E., Giraldez-Alvarez L.D., Milei J., Capani F.* Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift. Int. J. Dev. Neurosci. 29(6): 609–619. 2011.
https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.05.002

35. *Durán-Carabali L.E., Arcego D.M., Sanches E.F., Odorcyk F.K., Marques M.R., Tosta A., Reichert L., Carvalho A.S., Dalmaz C., Netto C.A.* Preventive and therapeutic effects of environmental enrichment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. Behav. Brain Res. 359: 485–497. 2019.
https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.036

36. *Northington F.J.* Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. ILAR J. 47(1): 32–38. 2006.
https://doi.org/10.1093/ilar.47.1.32

37. *Vannucci R.C., Vannucci S.J.* Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: Evolution of an animal model. Dev. Neurosci. 27(2-4): 81–86. 2005.
https://doi.org/10.1159/000085978

38. *Marriott A.L., Rojas-Mancilla E., Morales P., Herrera-Marschitz M., Tasker R.A.* Models of progressive neurological dysfunction originating early in life. Prog. Neurobiol. 155: 2–20. 2017.
https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.10.001

39. *Chen W.F., Chang H., Huang L.T., Lai M.C., Yang C.H., Wan T.H., Yang S.N.* Alterations in long-term seizure susceptibility and the complex of PSD-95 with NMDA receptor from animals previously exposed to perinatal hypoxia. Epilepsia. 47(2): 288–296. 2006.
https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00420.x

40. *Mikati M.A., Zeinieh M.P., Kurdi R.M., Harb S.A., El Hokayem J.A., Daderian R.H., Shamseddine A., Obeid M., Bitar F.F., El-Sabban M.* Long-term effects of acute and of chronic hypoxia on behavior and on hippocampal histology in the developing brain. Brain Res. Dev. Brain Res. 157(1): 98–102. 2005.
https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.03.007

Impact of Acute Normobaric Hypoxia in 10-Day-Old Rats on Sensorimotor Development and Behaviour of Animals

D. D. Khukhareva[a], Yu. A. Sukhanova[a], E. A. Sebentsova[a], and N. G. Levitskaya[a, b, *]

[a] *Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*
[b] *Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Science, Moscow, Russia*
**e-mail: nglevitskaya@gmail.com*

Fetal or newborn hypoxia is a major cause of neonatal mortality and induces long-term motor and cognitive impairment. The aim of the presented work was to study the effects of an acute normobaric hypoxia in rats at the age of 10 days (a model of full-term human pregnancy). Male and female Wistar rats were exposed to hypoxic condition (oxygen content – 8% for 2 h). Control animals were kept in the same conditions with normal oxygen content. From 11 to 35 days of life, the level of physical and motor development, motor and exploratory activity, and the level of anxiety were assessed. During hypoxic exposure the level of lethality was 21.1%. In rats of both sexes, there was a slowdown in weight gain and retarded performance of motor reflexes. Impaired motor coordination and ability to keep balance were recorded in male, but not in female rats underwent neonatal hypoxia. Adolescent female rats subjected to hypoxia demonstrated increased anxiety-like behaviour in elevated plus maze test. The results obtained indicate the gender-specific manner of the effects of neonatal hypoxia. The described method can be considered as a model of hypoxic brain damage in full-term newborns.

Keywords: perinatal hypoxia, model of full-term pregnancy, sensorimotor development, anxiety, rat

ЦИТИРОВАТЬ:

Хухарева Д.Д., Суханова Ю.А., Себенцова Е.А., Левицкая Н.Г. Влияние однократной нормобарической гипоксии у крыс в возрасте 10 дней на сенсомоторное развитие и поведение животных. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(2): 187–202. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020023

TO CITE THIS ARTICLE:

Khukhareva D.D., Sukhanova Yu.A., Sebentsova E.A., Levitskaya N.G. Impact of acute normobaric hypoxia in 10-day-old rats on sensorimotor development and behaviour of animals. Russian Journal of Physiology. 107(2): 187–202. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020023

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 2, с. 203–220

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РАЗВИТИЕ ОСЕВОЙ ЛОКОМОТОРНОЙ МУСКУЛАТУРЫ У ПОЛОВОЗРЕЛОГО ОКУНЯ-КЛЮВАЧА *SEBASTES MENTELLA* (SEBASTIDAE)

© 2021 г. В. П. Панов[1, *], С. С. Сафонова[1], А. М. Орлов[2, 3, 4, 5, 6, 7], А. Ю. Рольский[8, 9], Д. В. Артеменков[3]

[1]Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

[2]Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Москва, Россия

[3]Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), Москва, Россия

[4]Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

[5]Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

[6]Прикаспийский институт биологических ресурсов ДФИЦ РАН, Махачкала, Россия

[7]Томский государственный университет, Томск, Россия

[8]Полярный филиал ВНИРО (ПИНРО им. Н.М. Книповича), Мурманск, Россия

[9]Мурманский государственный технический университет, Мурманск, Россия

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

Поступила в редакцию 17.10.2020 г.
После доработки 02.12.2020 г.
Принята к публикации 13.12.2020 г.

Приводятся результаты исследования гистологической структуры локомоторной осевой (скелетной) мышечной ткани окуня-клювача *Sebastes mentella* и рассматриваются ее онтогенетические изменения. Его скелетная мускулатура состоит из белых и красных волокон. Получены данные по количественному распределению указанных волокон вдоль тела половозрелых рыб в кранио-каудальном направлении, их соотношение в туловищной и хвостовой частях. Диаметр этих двух типов волокон достигает значительных размеров, как у ряда глубоководных медленнорастущих видов (>300 мкм – белые волокна, >150 мкм – красные волокна). Плотность белых волокон выше, чем красных (80.7 ± 2.0 против 54.7 ± 1.5%), что обусловлено различным содержанием жировой и соединительной ткани (эндомизия). Вариабельность белых волокон у большинства размерных групп рыб существенно ниже, чем красных. Особенностью, которая не отмечена у других глубоководных видов рыб с невысокой скоростью роста, является относительно частая встречаемость красных волокон с расслоением саркоплазмы на две зоны (слоя) – внешнюю и внутреннюю (“двойные” структуры), природа которой пока неясна.

Ключевые слова: окунь-клювач *Sebastes mentella*, белые и красные мышцы, диаметр, распределение мышечных волокон

DOI: 10.31857/S0869813921020059

Среди четырех видов морских окуней рода *Sebastes*, обитающих в северной Атлантике и морях Северного Ледовитого океана наиболее массовым является окунь-

клювач *S. mentella* [1–4]. Вопросам биологии, экологии и распространению этого промыслового вида посвящен ряд работ [3, 5–10].

Окунь-клювач относится к медленнорастущим видам рыб. Известно, что прирост длины у половозрелых особей не превышает 1.0 см в год [10–13]. Максимальные абсолютные и относительные приросты отмечены у неполовзрелых особей, которые составляют 1.7–2.1 см, или 6.2–9.4% в год [3]. По мере созревания приросты снижаются и в возрасте 10–19 лет составляют 1.1–1.7 см и 3.0–4.6% соответственно. Начиная с возраста 21-го года, они снижаются еще в большей степени (абсолютные – до 0.5–1.0 см, относительные – до 1.0–2.2%) [3]. Окунь-клювач в массе, независимо от места обитания, созревает поздно – в возрасте 9–19 лет при длине 29–45 см [14].

Рост животного в целом определяется ростом отдельных частей его тела, поэтому морфологические исследования различных видов приобретают важное значение. Общая характеристика внешней морфологии окуня-клювача представлена в отдельных работах [6, 15, 16].

Основной морфологической структурой тела, которая определяет интенсивность роста животных, является соматическая или скелетная мускулатура. Вопросам, связанным с развитием мышц, уделяется большое внимание при искусственном выращивании различных видов рыб, в том числе, морских – обыкновенного лаврака *Dicentrarchus labrax*, атлантической трески *Gadus morhua*, спара золотистого *Sparus aurata*, зубана *Dentex dentex* и др. [17–21].

В теле большинства видов рыб, как пресноводных, так и морских, топографически выделяются две хорошо выраженные мышцы – красная (*musculus lateralis superficialis*) и белая (*musculus lateralis profundus*) [22]. Красные мышцы находятся непосредственно под кожей вдоль горизонтальной миосепты от головы до хвостового плавника. Их волокна содержат много миоглобина и дыхательных ферментов. Белые мышцы располагаются глубже и отличаются более светлой окраской. Волокна этого типа отличаются высоким содержанием ферментов анаэробного цикла и получают энергию за счет гликолиза. Две эти морфологические структуры в соответствии с присущим им метаболизмом относятся к различным локомоторным системам [22–25]. У большинства видов рыб красные мышцы функционируют при относительно невысоких скоростях плавания, а белые – при быстрых и резких движениях [26–28]. Соотношение этих двух типов мышц в теле рыб в каудальном направлении изменяется: доля красных мышц увеличивается, а белых– уменьшается [29–31]. Красные мышечные волокна тонкие, в поперечном сечении округлые и плотно лежащие. В отличие от красных, белые волокна угловатые, крупные и более разнообразные по размеру [32–36].

Так как североатлантические окуни рода *Sebastes* не являются объектами аквакультуры, с этим, по-видимому, связано отсутствие опубликованных данных об их росте и гистологической структуре скелетных мышц, в том числе и окуня-клювача, ценной в пищевом отношении рыбы. Данный вид является важным объектом промысла, пищевую ценность его определяет, прежде всего, скелетная мускулатура, исследования которой в различных направлениях являются актуальными и перспективными. Целью настоящего исследования является определение морфофункциональных особенностей соматической мускулатуры у половозрелого окуня-клювача различного возраста.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор материала для изучения гистоструктуры окуня-клювача осуществлен в период научно-исследовательских работ в июне-июле 2018 г. на борту НИС “Атлантида” в море Ирмингера (59°60′–64°60′ с.ш., 26°20′–41°50′ з.д.) в районе регулиро-

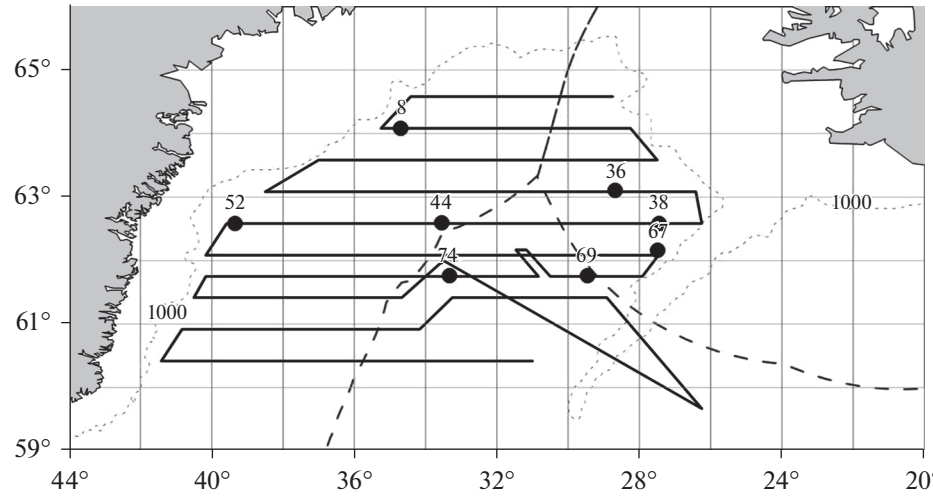

Рис. 1. Район и маршрут выполненной работы НИС “Атлантида” (черная линия) с местами сбора образцов для изучения гистоструктуры клюворылого окуня (● – места отбора проб с номерами тралений; – – маршрут судна; --- – границы ИЭЗ).

Fig. 1. Area and worked route by R/V Atlantida (black line) with sampling sites for studying the histostructure of beaked redfish (● – sampling sites with trawl numbers; – – vessel route; --- – EEZ boundaries.

вания НЕАФК (Комиссия по рыболовству в северо-восточной части Атлантики), включая открытые воды и исключительные экономические зоны (ИЭЗ) Гренландии и Исландии. При проведении траловых работ использовали разноглубинный трал 78.7/416 м проекта 2492-02, канатная и сетная части которого изготовлены из современных облегченных материалов, размеры ячеи в крыльях 68 мм и кутце 16 мм.

Для изучения гистоструктуры клюворылого окуня отобраны 24 пробы из уловов 8-ми тралений на глубинах 650 и 700 м (рис. 1). Видовую идентификацию рыб в уловах осуществляли по рекомендованным определителям [5]. Объектами настоящего исследования послужили самки и самцы клюворылого окуня *Sebastes mentella* (табл. 1) длиной 32–40 см и 33–42 см и массой 334–940 и 334–954 г. соответственно. Возраст рыб определяли по методике изучения возраста окуней с помощью отолитов и чешуи, которая изложена в Руководстве по выполнению Международной глубоководной пелагической экосистемной съемки в море Ирмингера и сопредельных водах, разработанное и утвержденное WGIDEEPS [37].

Образцы мышц были взяты за головой, у основания спинного плавника (в средней части туловища) и в области хвостового стебля (рис. 2). Отбор образцов происходил по одной схеме у всех рыб. Собранные пробы хранились в зафиксированном состоянии в 4%-ном растворе формалина. Для получения желатиновых срезов выполнялась проводка образцов через растворы желатина различных концентраций (7, 12.5 и 25%) при 37°С. Гистологические срезы толщиной 15 мкм получали на замораживающем микротоме МЗП-01 Техном, оснащенном охладителем ОМТ 28-02 Е. Окраска осуществлялась Суданом III (Вектон, Россия), окрашивающим жир оранжевым цветом, и гематоксилином Каррацци (Абрис+, Россия), окрашивающим ядра в сине-фиолетовый цвет. Для исследования полученных препаратов использовали световой микроскоп Микромед С-1 с объективами 4/0.10 160/0.17; 10/0.25 160/0.17 и S40/0.65 160/0.17. На препаратах определяли диаметр белых и красных мышечных волокон и их плотность [38]. Красные и белые волокна дифференциро-

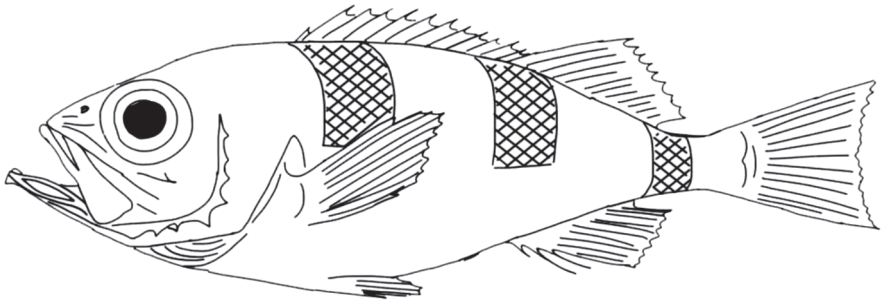

Рис. 2. Схема мест отбора гистологических проб у окуня-клювача. Образцы мускулатуры были собраны за головой, у основания спинного плавника (в средней части туловища) и в области хвостового стебля (обозначено черной штриховкой).
Fig. 2. Diagram of places for sampling histological samples from a beaked redfish. Muscle samples were collected behind the head, at the base of the dorsal fin (in the middle part of the body) and in the area of the caudal stem (indicated by black shading).

вались по среднему диаметру, интенсивности окраски и расположению миофибрилл. Микрофотографии были сделаны при помощи фотоаппарата Sony Cybershot и обработаны с использованием программы PixBuilder Studio. Методом аппликации устанавливали долю поверхностных боковых мышц в области хвостового стебля [39]. Полученный материал обработан статистически с использованием программного

Таблица 1. Информация о поимках клюворылого окуня
Table 1. Information on captures of beaked redfish

Пол Sex	Длина, см Length, cm	Масса, г Weight, g	Дата поимки Catch date	№ Трала Trawl №	Широта, с.ш. Latitude, N	Долгота, з.д Longitude, W	Глубина, м Depth, m
Самки Females	370	608	15.06.2018	8	64°05′	34°42′	700
	400	940	23.06.2018	36	63°06′	28°41′	700
	400	890	23.06.2018	36	63°06′	28°41′	700
	380	728	24.06.2018	38	62°35′	27°27′	700
	300	352	26.06.2018	44	62°35′	33°32′	700
	300	344	26.06.2018	44	62°35′	33°32′	700
	330	432	28.06.2018	52	62°35′	39°21′	700
	320	384	28.06.2018	52	62°35′	39°21′	700
	360	546	03.07.2018	69	61°45′	29°27′	650
	340	522	04.07.2018	74	61°46′	33°20′	650
Самцы Males	420	878	15.06.2018	8	64°05′	34°42′	700
	390	606	15.06.2018	8	64°05′	34°42′	700
	300	334	15.06.2018	8	64°05′	34°42′	700
	400	748	15.06.2018	8	64°05′	34°42′	700
	340	448	15.06.2018	8	64°05′	34°42′	700
	340	554	15.06.2018	8	64°05′	34°42′	700
	370	618	15.06.2018	8	64°05′	34°42′	700
	410	942	24.06.2018	38	62°35′	27°27′	700
	420	954	26.06.2018	44	62°35′	33°32′	700
	410	786	26.06.2018	44	62°35′	33°32′	700
	390	692	26.06.2018	44	62°35′	33°32′	700
	350	528	28.06.2018	52	62°35′	39°21′	700
	370	648	02.07.2018	67	62°10′	27°29′	700
	330	396	04.07.2018	74	61°46′	33°20′	650

Таблица 2. Соотношение максимальных и минимальных диаметров белых и красных мышечных волокон и их вариабельность
Table 2. The ratio of the maximum and minimum diameters of white and red muscle fibers and their variability

Размерные группы рыб Fish size group	Возраст, лет Age, years	Длина рыб, мм* Fish length, mm	Масса рыб, г* Fish weight, g	Белые волокна White fibers		Красные волокна Red fibers	
				max/min	Cv,%	max/min	Cv,%
1 ($n = 4$)	12.2 ± 0.7	305.0 ± 5.0 300–320	353.5 ± 10.8 334–384	6.8	34.6	10.6	66.0
2 ($n = 3$)	14.2 ± 0.3	333.3 ± 3.3 330–340	425.3 ± 15.4 396–448	6.6	33.9	15.7	73.6
3 ($n = 4$)	15.1 ± 0.8	347.5 ± 4.8 340–360	537.5 ± 7.5 522–554	5.6	32.9	10.8	61.0
4 ($n = 4$)	17.2 ± 0.8	375.0 ± 5.0 370–390	620.0 ± 9.7 606–648	4.4	27.4	8.1	43.5
5 ($n = 4$)	18.7 ± 1.1	395.0 ± 6.5 380–410	738.5 ± 19.6 692–786	5.0	27.7	10.5	45.2
6 ($n = 2$)	20.0 ± 1.5	410.0 ± 10.0 400–420	884.0 ± 6.0 878–890	4.9	28.3	9.0	61.0
7 ($n = 3$)	20.1 ± 1.1	410.0 ± 5.8 400–420	945.3 ± 4.4 940–954	4.3	29.7	14.2	48.5
Среднее Average	16.8 ± 1.2	364.2 ± 8.0	619.9 ± 41.4	5.4	30.6	11.3	57.0

* Над чертой дроби – среднее значение и ошибка, под чертой – минимум и максимум.
* Above the line of the fraction is the average value and standard error, under the line minimum and maximum.

обеспечения Microsoft Office Excel. Рассчитывались такие показатели как среднее абсолютное значение со стандартной ошибкой средней ($M \pm m$), коэффициент вариации (Cv, %). Достоверность различий определялась по t-критерию Стьюдента при $p \le 0.05$ (по Пирсону).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Скелетная мускулатура окуня-клювача состоит из белых (быстрых) и красных (медленных) волокон [40, 41]. Красные мышцы располагаются под кожей вдоль средней линии на протяжении туловища и хвоста рыб. Остальная масса осевой мускулатуры представлена более глубоко расположенными белыми волокнами (табл. 2). Окунь-клювач, независимо от массы, обладает очень крупными как белыми, так и красными мышечными волокнами, несмотря на небольшие размеры рыб. В возрасте 12 лет у мелких рыб (группа 1) диаметр белых мышечных волокон вдоль тела (от головы до хвоста) не различается (табл. 2). По достижении 14 лет у более крупных рыб (начиная с группы 2), как правило, по средним значениям, рассчитанным по трем точкам отобранных образцов мышечной ткани, диаметр волокон увеличивается с 109.8 ± 0.7 до 149.5 ± 13.0 мкм ($p \le 0.05$). У головы и в туловище под спинным плавником размеры волокон имеют сходные диаметры, а в хвостовой части они существенно мельче ($p \le 0.05$). Диаметр отдельных белых волокон, расположенных у го-

Таблица 3. Морфометрия белых мышечных волокон в различных частях тела рыб
Table 3. Morphometry of white muscle fibers in different parts of the fish body

Группа рыб Fish group	Диаметр волокон, мкм Fibres diameter, μm			Плотность волокон, % Fibers density, %		
	голова head (n = 200–400)	туловище middle part of the body (n = 200–400)	хвост tail (n = 150–350)	голова head	туловище middle part of the body	хвост tail
1	108.3 ± 2.0 41.3–280.5	110.7 ± 2.0 41.3–231.0	108.7 ± 2.8 41.3–330.0	81.5	93.5	81.4
2	129.5 ± 2.5 33.0–280.5	131.2 ± 2.8 49.5–272.3	112.9 ± 2.6* 33.0–214.5	88.8	90.6	81.6
3	137.3 ± 2.1 49.5–297.0	143.5 ± 3.1 57.8–297.0	119.8 ± 3.0* 49.5–280.5	88.9	93.5	81.2
4	148.0 ± 2.1 57.8–247.5	143.1 ± 2.1 57.8–297.0	130.4 ± 2.4* 66.0–255.8	92.5	76.0	67.6
5	152.1 ± 2.6 66.0–330.0	153.7 ± 2.0 66.0–297.0	133.1 ± 2.1* 66.0–363.0	85.1	77.4	70.1
6	144.4 ± 2.4 66.0–264.0	141.6 ± 3.1 57.8–379.5	116.5 ± 2.4* 49.5–198.0	65.9	86.7	64.6
7	168.24 ± 3.6 49.5–330.0	155.7 ± 2.8 82.5–280.5	127.4 ± 3.0* 66.0–247.5	73.9	82.4	71.9
Среднее Average	141.1 ± 7.1 51.9–289.9	139.9 ± 5.7 58.9–293.5	121.3 ± 3.4* 53.0–269.9	82.4 ± 3.6	85.7 ± 2.8	74.0 ± 2.7

* В табл. 3 и 4 – разность по сравнению с головой достоверна при $p \le 0.05$. Над чертой – средние значения показателя. Под чертой – пределы колебания показателя.
* In tables 3 and 4, the difference compared to the head is significant at $p \le 0.05$. Above the line – average values of the indicator. Under the line – the limits of the indicator fluctuation.

ловы, достигает 330 мкм, в туловище – 380 и в хвосте – 363 мкм. Среднее соотношение наиболее крупных волокон и самых мелких составляет у головы – 5.6, в туловище – 5.2, в хвосте – 5.1. При этом коэффициент вариации колеблется в пределах 29.2–30.6%.

В среднем, вариабельность красных мышечных волокон по диаметру существенно превышает величину этого показателя в белых волокнах (разница 26.4%). Соответственно наблюдается снижение значений коэффициента вариации с 34.6 до 29.7%. Возможно, в связи с отсутствием некоторых образцов такой достаточно четкой картины не наблюдается в красных мышцах (табл. 2).

Плотность волокон постепенно уменьшается с возрастом рыб, однако четкой закономерности в этом процессе не наблюдается. Во многом это определяется топографией белых мышц. В среднем, плотность быстрых волокон по трем областям тела окуней разных размерных групп 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 составляет: 85.5 ± 4.0; 87.0 ± 2.8; 87.9 ± 3.6; 78.7 ± 7.3; 77.5 ± 4.3; 72.3 ± 7.1 и 76.1 ± 3.2% соответственно. При этом отмечается тенденция к снижению мышечного компонента в хвосте рыб (табл. 3).

Таблица 4. Морфометрия красных мышц в различных частях рыб
Table 4. Morphometry of red muscles in different parts of fish

Группа рыб Fish group	Диаметр волокон, мкм Fibres diameter, μm			Плотность волокон, % Fibers density, %		
	голова head (n = 50–100)	туловище middle part of the body (n = 50–150)	хвост tail (n = 130–350)	голова head	туловище middle part of the body	хвост tail
1	$\frac{28.8 \pm 1.5}{8.3–82.5}$	$\frac{30.5 \pm 1.9}{11.6–66.0}$	$\frac{36.4 \pm 1.4^*}{8.3–148.5}$	50.9	50.5	52.5
2	$\frac{26.7 \pm 1.9}{8.3–107.3}$	$\frac{29.5 \pm 2.1}{8.3–148.5}$	$\frac{30.1 \pm 2.1}{8.3–132.0}$	51.3	52.2	50.8
3	$\frac{35.4 \pm 3.6}{13.2–82.5}$	–	$\frac{41.1 \pm 1.6}{8.3–148.5}$	52.0	–	57.9
4	–	$\frac{43.1 \pm 3.1}{14.9–87.5}$	$\frac{40.4 \pm 1.0}{8.3–99.0}$	–	52.4	51.0
5	$\frac{46.7 \pm 2.7}{9.9–123.8}$	$\frac{49.0 \pm 3.1}{16.5–107.3}$	$\frac{50.4 \pm 1.1}{9.9–148.5}$	52.8	69.9	61.1
6	–	–	$\frac{45.9 \pm 2.7}{16.5–148.5}$	–	–	52.2
7	-–	–	$\frac{45.8 \pm 1.8}{9.9–140.3}$	–	–	62.4
Среднее Average	$\frac{34.4 \pm 4.5}{9.9–99.0}$	$\frac{38.0 \pm 4.8}{12.8–102.3}$	$\frac{41.4 \pm 2.5}{9.9–137.9}$	51.8 ± 0.4	56.2 ± 4.5	55.4 ± 1.9

В возрасте 19 лет средний диаметр мышечных волокон у окуня-клювача увеличивается до достижения рыбами определенной массы (738.5 г). В дальнейшем этот диаметр уменьшается, что может говорить о возможных процессах гиперплазии в белой мышечной ткани. При этом наблюдается уменьшение плотности волокон в области головы и хвоста (табл. 3).

Диаметр красных мышечных волокон у окуня-клювача, как и у большинства видов рыб, существенно меньше, чем белых. При этом можно отметить, что размеры медленных волокон в каудальном направлении изменяются незначительно или даже достоверно увеличиваются как, например, у самых мелких рыб (12 лет). Это свидетельствует о хорошо выраженной гипертрофии этого типа волокон у окуня-клювача. Подобно белым волокнам, диаметр красных в хвосте существенно уменьшается у определенной ранее группы рыб (6), что, возможно, обусловлено процессом гиперплазии (табл. 4). В среднем, максимальное соотношение наиболее крупных волокон к самым мелким составляет у головы 10.0, в туловище – 8.0, в хвосте – 13.9. При этом коэффициент вариации колеблется в пределах 53.0–56.2%. В белых волокнах наблюдаются хорошо выраженные, радиально расходящиеся миофибриллы и тонкий слой саркоплазмы под оболочной, в то время как в красных она располагаются точечно (рис. 3*A*, *B*). Как и диаметр, плотность красных во-

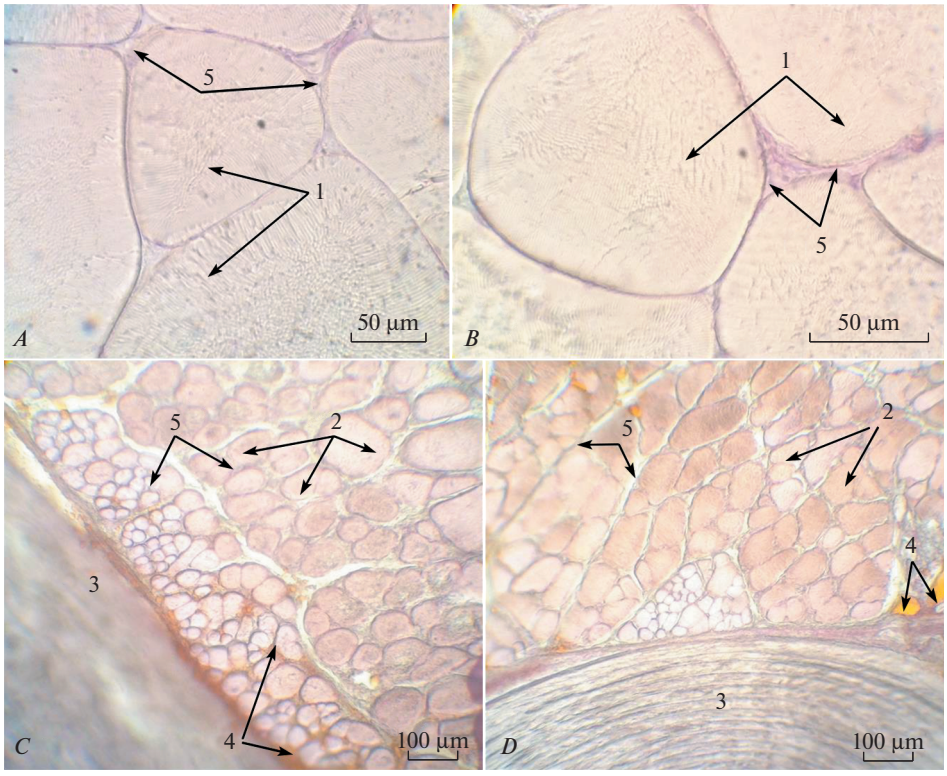

Рис. 3. Общий вид мускулатуры (в средней части туловища): *A* – белая мускулатура самки (группа 3, масса – 546 г), *B* – белая мускулатура самца (группа 4, масса – 606 г), *C* – красная мускулатура самки (группа 3, масса – 546 г), *D* – красная мускулатура самца (группа 4, масса – 606 г). 1 – белые мышечные волокна с радиально расположенными миофибриллами, 2 – красные мышечные волокна, 3 – кожа, 4 – липоциты, 5 – эндомизий. Увеличение: A, B – 600x; C, D – 150x.

Fig. 3. General view of the musculature (in the middle part of the body): *A* – white female musculature (group 3, weight – 546 g), *B* – white male musculature (group 4, weight – 606 g), C - red female musculature (group 3, weight – 546 g), *D* – red male musculature (group 4, weight – 606 g). 1 – white muscle fibers with radially located myofibrils, 2 – red muscle fibers, 3 – skin, 4 – lipocytes, 5 – endomysium. Magnification: *A*, *B* – 600x; *C*, *D* – 150x.

локон ниже, чем белых, что определяется хорошо развитым перимизием и интенсивным накоплением на его основе жировой ткани (рис. 3*C*, *D*).

У изученных рыб соотношение размерных групп белых мышечных волокон несколько изменяется. С увеличением массы окуней во всех отделах тела, как правило, уменьшается количество мелких волокон (30–80 мкм). Волокна диаметром менее 30 мкм, которые характерны для многих видов рыб, не отмечены. У мелких рыб (группы 1–3) модальный класс составляют волокна с диаметром 80–130 мкм (от 40 до 55%). У рыб в возрасте 17–20 лет (группы 4–7), в связи с процессами гипертрофии, модальный класс у головы и в туловище составляют волокна от 130 до 180 мкм (40–53%). Неизменной остается хвостовая часть, где модальный класс состоит из волокон от 80 до 130 мкм. Этим обуславливается снижение среднего диаметра волокон в каудальном направлении. Уменьшение среднего диаметра волокон у рыб 19 лет (группа 5), вероятно, связано с повышением доли волокон диаметром 80–130 мкм и снижением количества крупных (180–280 мкм) (рис. 4*A*).

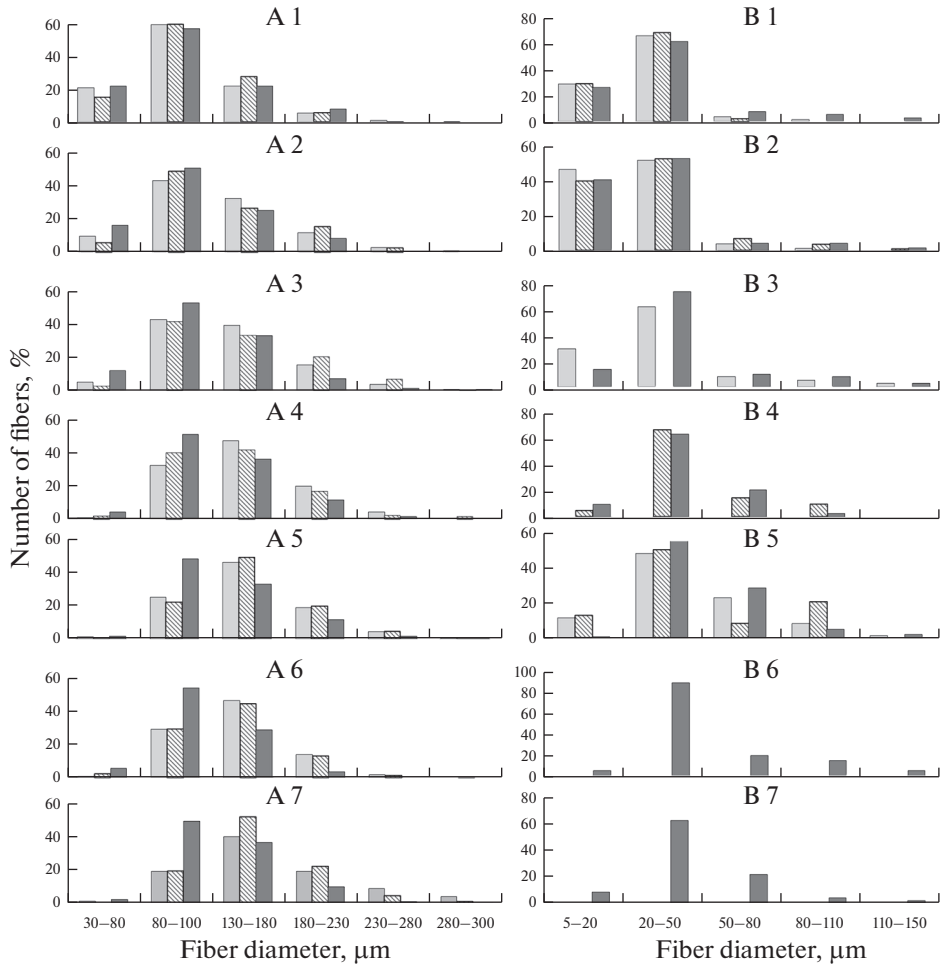

Рис. 4. Распределение диаметров белых и красных волокон: за головой (□), посередине туловища (▨), в хвосте (■). А1–А7 – белая мускулатура; В1–В7 – красная (цифры обозначают номера групп).

Fig. 4. Distribution of diameters of white and red fibers: behind the head (□), in the middle of the body (▨), in the tail (■). A1–A7 – white muscles; B1–B7 – red (numbers indicate group numbers).

Образцы мышечной ткани, взятые в различных частях тела рыб, оказались неполными. В связи с этим красные мышцы у некоторых размерных групп окуней были частично утрачены. Несмотря на это, на имеющихся образцах мышечной ткани, содержащих медленные волокна, можно выявить некоторые особенности в их количественной структуре. Фактически у всех размерных групп рыб модальным классом являются волокна диаметром 20–50 мкм. Их доля у головы составляет 50–66%, в середине туловища 50–70% и в хвосте 50–92%. В каудальной области наблюдаются и более крупные волокна, попадающие в класс 110–150 мкм (1.7–2.5%). При этом общей закономерности распределения этих волокон у разноразмерных рыб не отмечено, что связано, по-видимому, с чередующимися процессами гипертрофии и

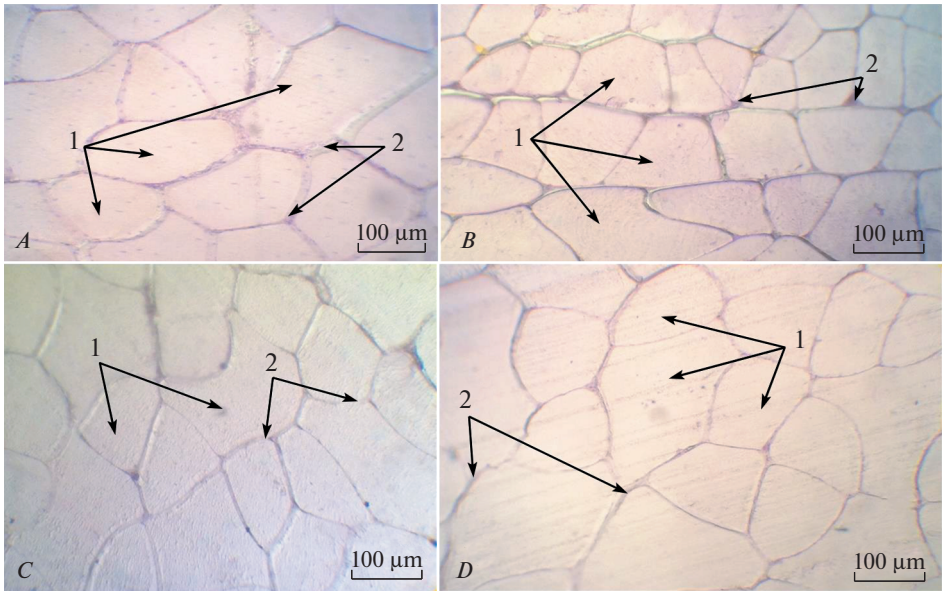

Рис. 5. Разнообразие форм белых волокон. *A* – группа 6, самка массой 890 г (позади головы), *B* – группа 5, самец массой 692 г (хвостовой стебель), *C* – группа 2, самка массой 432 г (позади головы), *D* – группа 4, самец массой 606 г (средняя часть туловища); 1 – мышечные волокна, 2 – эндомизий. Увеличение: 150×.
Fig. 5. A variety of forms of white fibers. *A* – group 6, female weighing 890 g (behind the head), *B* – group 5, male weighing 692 g (caudal peduncle), *C* – group 2, female weighing 432 g (behind the head), *D* – group 4, male weighing 606 g (middle part of the body); 1 – muscle fibers, 2 – endomysium. Magnification: 150×.

гиперплазии. Например, как и в случае с белыми волокнами, у рыб в из шестой группы отсутствуют самые крупные волокна (рис. 4*B*1–*B*7).

Для гистоструктуры белых мышц характерно незначительное содержание жировых включений. Крупные скопления липоцитов отмечены непосредственно под кожей и в красных мышцах. Белые волокна разделены тонким эндомизием. При этом между окислительными волокнами наблюдаются достаточно широкие соединительнотканные прослойки.

Белые мышечные волокна разнообразны по форме и расположению. Часто встречаются участки, состоящие из крупных волокон (до 300 мкм). На поперечном разрезе такие волокна имеют необычную форму. Они или удлиненные в разных направлениях или имеют вид нескольких сросшихся волокон. Наиболее часто такой тип волокон встречается у крупных рыб в возрасте 19–20 лет (группы 5–7) (рис. 5).

Форма поперечного среза белых волокон у изученных размерных групп рыб различается. У окуней первой группы преобладают угловатые по форме волокна. В последующем, с увеличением размеров особей, наблюдается постепенное сглаживание углов у волокон (группы 2–3). У крупных рыб (группы 4–7) подавляющее число волокон имеют округлую форму. Подобная структурная организация характерна для белой мускулатуры во всех частях туловища, но в каудальной части крупных рыб округлые волокна встречаются чаще, чем в мышцах непосредственно за головой и середине тела.

Волокна красных мышц имеют округлую, в массе однообразную форму. В то же время среди них встречаются довольно большие, в несколько раз превышающие

рядом лежащие, волокна (до 150 мкм). Визуально их количество увеличивается в каудальном направлении, что, вероятно, сказывается на среднем диаметре волокон в хвосте рыб. Для рыб 19–20 лет (группы 5–7) характерны видоизмененные красные волокна, саркоплазма которых визуально распадается на внешний и внутренний слои. Такие структуры встречаются непосредственно под кожей единично или группами по 5–10 штук среди обычных волокон. Периферический диаметр кольцевидного внешнего волокна составляет 115.8 ± 3.8 (Cv = 18.2%), а внутреннего – 57.1 ± 2.1. Отношение диаметра внешнего волокна к внутреннему составляет 2.10 ± 0.06.

Особенностью красных мышечных волокон (в отличие от белых) является большое количество саркоплазмы, которая находится под сарколеммой, а миофибриллы локализованы в центральной части [32, 34, 42]. Процессы, связанные с изменением структуры волокна, начинаются в центральной части, там, где располагаются миофибриллы (“инициаторы” расщепления). В последующем это получает продолжение в виде распространения “инициатора” в различных направлениях, вызывая смещение структур саркоплазмы. Это, возможно, приводит к определенным аномалиям в строении мышечного волокна, в частности, уменьшению площади, занимаемой миофибриллами. Конечный этап подобного рода изменений проявляется в виде обособления центральной части волокна, в которой концентрируются сократительные структуры. Для того, чтобы ответить на вопросы, приводят ли подобные изменения к отклонениям в работе миофибриллярного аппарата и сократительной функции волокна, а соответственно и локомоторной активности рыб, требуются дальнейшие исследования. На гистопрепаратах можно проследить предполагаемый процесс образования подобных волокон (рис. 6). В белых мышцах отмечены похожие, но единичные волокна.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Соматическая мускулатура окуня-клювача, подобно многим пресноводным и морским видам рыб, состоит из белых и красных волокон. Наряду с медленным ростом, характерной особенностью этих рыб является своеобразное строение мышечной ткани. Как белые, так и красные мышцы имеют в составе волокна с большим диаметром, что оказывает существенное влияние на их структуру. Превышение вариабельности красных волокон по диаметру данного показателя в белых волокнах обусловлено величиной соотношения крайних по размерам максимальных и минимальных медленных волокон. Особенностью быстрых волокон рыб является уменьшение этого соотношения с увеличением массы особей (с 8.6 до 4.3). Аналогичные гипертрофированные волокна отмечены у арктических видов рыб подотряда нототениевые Notothenioidei [43–46]. Большинство рыб этого подотряда (около 120 видов) обладают лабриформным способом локомоции (за счет вращения грудных плавников) и отличаются невысокой плавательной активностью [47, 48].

У пресноводных медленно растущих видов, к которым относятся ротан *Perccottus glehni*, обыкновенный хулиган *Gobiomorphus cotidianus*, толстоголовый гольян *Pimephales notatus*, крупных мышечных волокон, характерных для морских глубоководных рыб не отмечено [34, 49–51]. Причем подобные различия не связаны с размерами, поскольку у мелких глубоководных светящихся анчоусов (сем. Mystophidae) диаметр, прежде всего, белых мышечных волокон достигает значительных размеров [36].

Сведения об особенностях локомоции и скорости передвижения окуня-клювача отрывочны. Результаты наблюдений за распределением и поведением окуня в пелагиали моря Ирмингера из подводного аппарата [2] свидетельствуют о перемещении отдельных особей со скоростью 1.5–2 м/с. Благодаря активной нагульной и

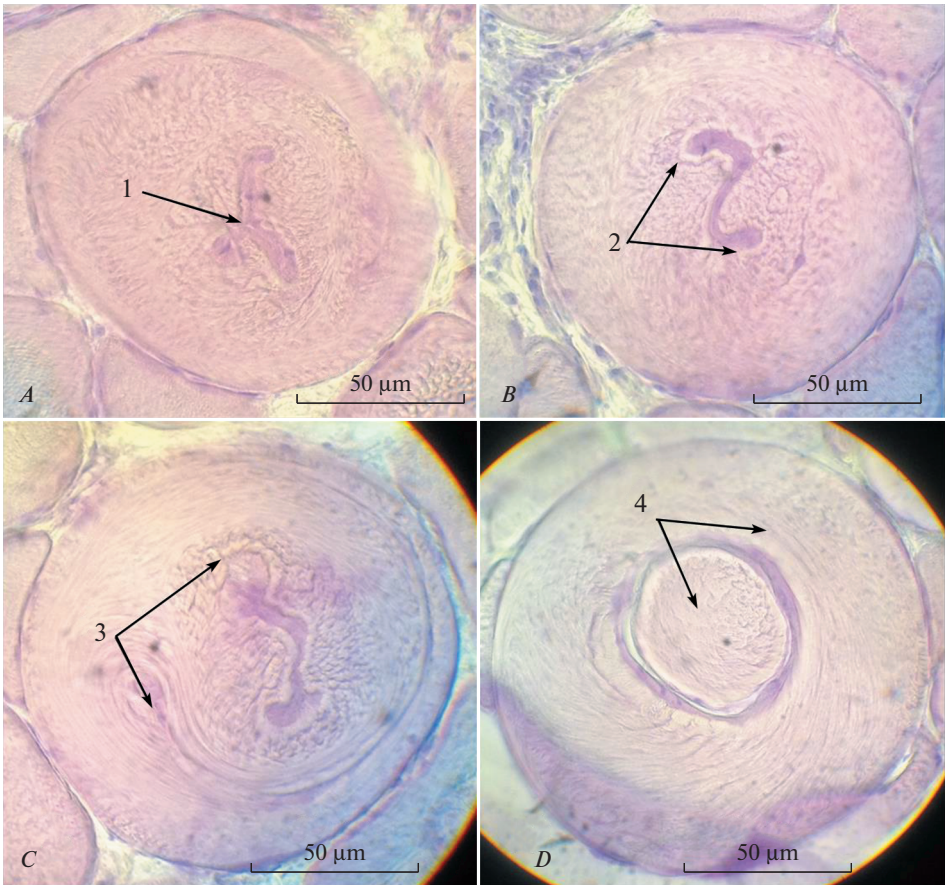

Рис. 6. Последовательные (*A*–*D*) стадии формирования расщепленного волокна в хвостовом стебле самки (группа 6, масса 890 г): 1 – появление в центре волокна “инициатора расщепления”, 2 – разрастание образования в разные стороны, 3 – смещение структур волокна, 4 – обособление центральной части. Увеличение: 600×.

Fig. 6. Consecutive (*A*–*D*) stages of the formation of a split fiber in the female caudal peduncle (group 6, weight 890 g): 1 – the appearance of a “cleavage initiator” in the center of the fiber, 2 – rowth of the formation in different directions, 3 – displacement of fiber structures, 4 – separation of the central part. Magnification: 600×.

нерестовой миграциям, обитанию в пелагиали над большими глубинами [2, 3], а также некоторым морфологическим особенностям строения тела [16], плавательная активность этого вида может быть относительно высокой.

Степень развития красных мышц на протяжении длины тела достаточно высока. У окуней соотношение красных мышц и площади поперечного среза тела составляет: за головой – 10.9 ± 1.0; под спинным плавником – 10.6 ± 1.2; в хвосте – 14.1 ± 0.7. Эта величина существенно выше, чем у таких подвижных рыб, обитающих на течении пресноводных видов, как чехонь *Pelecus cultratus*, жерех *Aspius aspius* и форель *Parasalmo mikiss* [52, 30]. При этом у некоторых активных видов антарктических нототениевых рыб *Notothenia gibberitrons* и *Pselograco breviceps* относительная площадь красных мышц составляет 22–31% [60].

По-видимому, размеры мышечных волокон также связаны с температурными условиями жизни. У видов рыб, обитающих при очень низкой температуре воды (–1.86°С), размеры волокон увеличиваются независимо от обитания в различных широтах [53–55]. При этом диаметр волокон у белокровных видов (ледяные рыбы семейства Chaenichthyidae) также больше, чем у рыб, в эритроцитах которых содержится гемоглобин [48, 56–58].

Гистоструктура локомоторной мускулатуры непосредственно приурочена к определенной части тела рыб. Процессы роста мышечной ткани, изменения диаметра волокон определяются дорсо-вентральными и кранио-каудальными градиентами [59–61]. По нашим данным, у большинства размерных групп окуня-клювача диаметр белых мышечных волокон уменьшается в каудальном направлении. Диаметр красных волокон, напротив, имеет тенденцию к увеличению в хвосте. Исследования, проведенные ранее, носят противоречивый характер. У радужной форели *Parasalmo mikiss* в мышцах, взятых на исследование под жировым плавником, исчезают мелкие волокна всех типов [62]. В то же время у атлантического лосося *Salmo salar*, независимо от режима плавания, белые волокна под спинным плавником крупнее, чем под жировым. Красные волокна, напротив, в передней части тела мельче расположенных каудальнее [63]. Два вида ледяных рыб семейства Chaenichthyidae и семь видов семейства Nototheniidae имеют характер распределения диаметров белых и красных волокон подобный тому, что отмечен для окуня-клювача. При этом считается, что наиболее вероятным фактором, влияющим на размеры мышечных волокон, являются метаболические процессы. При низком уровне обмена веществ образование молочной кислоты невелико, так что не требуется обширного развития кровеносных сосудов, как при высоком, вероятно, лимитирующем рост волокон [43]. По-видимому, это прежде всего касается белых мышечных волокон, диаметр которых в каудальном направлении уменьшается. Напротив, красные мышцы, относительная площадь которых в хвосте выше, чем в передней части тела рыб, состоят из более крупных волокон, что соответствует их энергетическим возможностям.

Наличие нетипичных по строению крупных красных волокон (двойных) у исследуемых рыб, по-видимому, не связано с нарушением условий фиксации и техникой получения гистологических срезов. Пока неясна природа подобного явления. Возможность нарушения морфогенеза может быть связана с достижением красными волокнами большого диаметра и нарушения определенного соотношения их структурных элементов. Однако у ряда видов нототениевых рыб (*Champsocephalus gunnari*, *Pagothenia hansoni*), отдельные красные волокна которых обладают более крупным диаметром (>150 мкм), имеют вполне типичную форму [45]. Относительно невысокая вариабельность таких волокон по периферическому и внутреннему диаметрам свидетельствует об определенной закономерности формирования подобного типа волокон. К этому подводит нас и представленный наглядный материал по этапному образованию волокон двойного строения у окуня-клювача. Достаточно ровные границы образованных структур наводят на мысль, с одной стороны, о физическом характере этого явления, а с другой – о биологическом, связанном с возможным проникновением под кожные покровы паразитических организмов.

Гистологическое строение скелетной мускулатуры окуня-клювача, в целом, подобно таковой других представителей глубоководной ихтиофауны (например, миктофовых и нототениевых). Они обладают хорошо развитыми поверхностными боковыми мышцами в каудальной части тела, что позволяет причислить их к видам рыб с достаточно высокой плавательной активностью. Условия местообитания окуня-клювача, такие как большая глубина и давление, низкие температура и содержание кислорода в воде, оказывают влияние на развитие различных систем ор-

ганов и определяют скорость обменных веществ и, соответственно, процессы роста. Данный вид, как медленно растущий, обладает особенностями, характерными для других представителей ихтиофауны с невысокой скоростью роста. В состав его соматической мускулатуры входят крупные как красные, так и белые волокна, отмеченные у многих антарктических видов рыб. Наблюдаются также и общие черты по размерному распределению волокон в кранио-каудальном направлении, в зависимости от их типа, с другими глубоководными видами. Главным образом, в красных мышцах присутствуют преобразованные волокна, отличительной чертой которых является разделение их саркоплазмы на два слоя: внешний и внутренний ("двойные" волокна), что пока не получает однозначного объяснения. В связи с тем, что окунь-клювач является ценным промысловым объектом, исследования, направленные на выяснение различных сторон биологии этого вида, являются актуальными и нуждаются в дальнейшем развитии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Морфофункциональное состояние окуня-клювача, как и других пелагических глубоководных видов рыб, определяется условиями существования на большой глубине. Температурный фактор, давление, трофика, существование без света оказывают влияние на все структуры организма и, безусловно, на локомоторную функцию, что определяется развитием мышечной системы. Гистоструктура соматической мускулатуры изменяется в процессе роста окуня-клювача и проявляется на каждом этапе развития характерными чертами в виде формы, размеров, вариабельности и соотношения волокон мышц различных морфофункциональных типов. Глубоководные рыбы отличаются важной особенностью, которая выражается в высокой степени гипертрофии мышечных волокон обоих типов: белых и красных. Окунь-клювач не является исключением из этого правила (белые и красные волокна достигают в диаметре более 300 и 100 мкм соответственно). При этом достаточно хорошо выраженной особенностью этого вида является высокая степень вариабельности красных волокон по сравнению с белыми (57.0 ± 3.41 и 30.6 ± 0.89 соответственно). В отличие от других пелагических глубоководных видов рыб и прежде всего в красных мышцах, отмечены специфические структурные изменения в волокнах, выраженные в разделении саркоплазмы на два слоя. Выявленный артефакт пока носит описательный характер, но причина подобного явления неясна и требует дальнейшего исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (ФГБНУ "ВНИРО").

Вклад авторов А.Ю. Рольского и Д.В. Артеменкова состоит в участии и сборе материала по окуням в июне-июле 2018 г. на борту НИС "Атлантида", а также совместно с А.М. Орловым, В.П. Пановым и С.С. Сафоновой в подготовке данной публикации. В.П. Панов и С.С. Сафонова исследовали собранный гистологический материал по окуням.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Павлов А.И., Мамылов В.С., Носков А.С.* Распределение, особенности биологии, состояние запасов окуня-клювача (*Sebastes mentella* Travin) в море Ирмингера. Биоресурсы мезо- и батипелагиали открытой части Северной Атлантики. Сб. научн. трудов ПИНРО. Мурманск. 166–198. 1989. [*Pavlov A.I., Mamylov V.S., Noskov A.S.* Distribution, peculiarities of biology, state of stocks of beaked redfish (*Sebastes mentella* Travin) in the Irminger Sea. Bioresources of the meso- and bathypelagic zone of the open part of the North Atlantic. Collection of scientific works of PINRO. Murmansk. 166–198. 1989. (In Russ)].

2. *Павлов А.И., Шибанов В.Н.* Исследования биологических ресурсов пелагиали и талассобатиали открытой части Северной Атлантики. Комплексные рыбохозяйственные исследования ПИНРО на Северном бассейне: итоги и перспективы. Сб. научн. трудов ПИНРО. Мурманск. 104–117. 1991. [*Pavlov A.I., Shibanov V.N.* Research of biological resources of the pelagic and thalassobathials of the open part of the North Atlantic. Integrated fishery research of PINRO in the Northern basin: results and prospects. Collection Scient. Works of PINRO. Murmansk. 104–117. 1991. (In Russ)].
3. *Мельников С.П.* Океанический окунь-клювач Северной Атлантики. Мурманск. ПИНРО. 2006. [Melnikov S.P. Oceanic beaked redfish of the North Atlantic. Murmansk. PINRO. 2006. (In Russ)].
4. *Planque B., Kristinsson K., Astakhov A., Bernreuther M., Bethke E., Drevetnyak K., Nedreaas K., Reinert J., Rolskiy A., Sigurðsson T., Stransky C.* Monitoring beaked redfish *(Sebastes mentella)* in the North Atlantic, current challenges and future prospects. Aquatic Living Resources. 26: 293–306. 2013.
https://doi.org/10.1051/alr/2013062
5. *Барсуков В.В., Литвиненко Н.И., Серебряков В.П.* Методические указания по определению видов морских окуней северной части Атлантического океана и прилегающих морей. Калининград. АтлантНИРО. 1984. [*Barsukov V.V., Litvinenko N.I., Serebryakov V.P.* Methodological guidelines for determining the species of redfishes in the North Atlantic Ocean and adjacent seas. Kaliningrad. AtlantNIRO. 1984. (In Russ)].
6. *Барсуков В.В., Оганин И.А., Павлов А.И.* Морфологические и экологические особенности различия *S. fasciatus* и *S. mentella* на Ньюфаулендском шельфе и банке Флемин-Кан. Вопр. ихтиол. 30(5): 791–803. 1990. [*Barsukov V.V., Oganin I.A., Pavlov A.I.* Morphological and ecological features of the difference between *S. fasciatus* and *S. mentella* on the Newfauland shelf and the Flemin-Kahn Bank. J. Ichthyol. 30(5): 791–803. 1990. (In Russ)].
7. *Hureau J.P., Litvinenko N.I.* Scorpaenidae. In: Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. UNESCO. 3: 1211–1229. 1986.
8. *Павлов А.И.* Распределение и поведение клюворылого морского окуня (*Sebastes mentella* Travin) на хребте Рейкъянес по наблюдениям из подводного аппарата "Север-2". Биологические ресурсы талассобатиальной зоны Мирового океана. Тезисы докл. Всесоюзн. совещания. Москва. 54–55. 1988. [*Pavlov A.I.* Distribution and behavior of the beaked seabass (*Sebastes mentella* Travin) on the Reykjanes Ridge as observed from the underwater vehicle "North-2". Biological resources of the thalassobathial zone of the World Ocean. Theses of the Reports of the All-Union Meeting. Moscow. 54–55. 1988. (In Russ)].
9. *Magnússon J., Magnússon J.V., Sigurdsson T.* On the distribution and biology of the oceanic redfish in March 1995. ICES. C.M. G40. 1995.
10. *Saborido-Rey F., Garabana D., Cerviño S.* Age and growth of redfish (*Sebastes marinus, S. mentella, and S. fasciatus*) on the Flemish Cap (Northwest Atlantic). ICES J. Mar. Sci. 61(2): 231–242. 2004.
https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2003.11.003
11. *Травин В.И.* Новый вид морского окуня в Баренцевом море (*Sebastes mentella*, Travin sp. nov.). Докл. АН СССР. 77(4): 741–744. 1951. [*Travin V.I.* A new species of seabass in the Barents Sea (*Sebastes mentella*, Travin sp.nov.). Dokl. AS SSSR. 77(4): 741–744. 1951. (In Russ)].
12. *Шестова Л.М.* О наступлении половой зрелости окуня-клювача Баренцева и Норвежского морей. Труды ПИНРО. 37: 35–42. 1976. [*Shestova L.M.* On the onset of sexual maturity of the beak perch in the Barents and Norwegian Seas. Tr. PINRO. 37: 35–42. 1976. (In Russ)].
13. *Haunscild G.* Method of age determination of redfish used G.D.R. and result. ICES. C.M. G47. 1978.
14. *Melnikov S.P.* Intraspecific structure of beaked redfish *Sebastes mentella* of the Atlantic and Arctic oceans. J. Ichthyol. 56(1): 52–71. 2016.
15. *Power D.J., Ni I.H.* Morphometric differences between golden redfish (*Sebastes marinus*) and beaked redfishes (*S. mentella and S. fasciatus*). J. Northwest. Atl. Fish. Sci. 6: 1–7. 1985.
https://doi.org/10.2960/J.V6.A1
16. *Garabana D.* The genus Sebastes Cuvier, 1829 (Pisces, Scorpaenidae) in the North Atlantic: Species and stock discrimination using traditional and geometric morphometrics. PhD Thesis. Spain. University of Vigo. 2005.
17. *Nathanailides C., Lopez-Albors O., Abellan E., Vazquez J.M., Tyler D.D., Rowlerson A., Stickland N.C.* Muscle cellularity in relation to somatic growth in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Aquac. Res. 27: 885–889. 1996.
https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1996.t01-1-00819.x
18. *Patruno M., Radaelli G., Mascarello F., Candia Carnevali M.D.* Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost during development from hatching to juvenile. Anat. Embryol. 198: 487–504. 1998.
https://doi.org/10.1007/s004290050199
19. *Galloway T.F., Kjersvik E., Kryvi H.* Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) related to different somatic growth rates. J. Exp. Biol. 202: 2111–2120. 1999.

20. *Koumoundouros G., Divanach P., Kentouri M.* Ontogeny and allometric plasticity of (Osteichthyes: Sparidae) in rearing conditions. Mar. Biol. 135: 561–572. 1999. https://doi.org/10.1007/s002270050657
21. *Periago M.J., Ayala M.D., Lopez-Albors O., Abdel I., Martınez C., Garcıa-Alcazar A., Ros G., Gil F.* Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass. Aquaculture. 249: 175–188. 2005. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.047
22. *Лав Р.М.* Химическая биология рыб. Пищевая промышленность. 1976. [*Lav R.M.* Chemical Biology of Fish. Food Industry. 1976. (In Russ)].
23. *Greene C.W.* An undescribed longitudinal differentiation of the great lateral muscle of the king salmon. Anat. Rec. 7: 99–101. 1913.
24. *Boddeke R., Slijpear B.J., van der Stelt.* Histological characteristics of the body musculature of fishes in connection with their mode of life. Wetenschappen. Koninklijke Ned. Acad. Ser.C. 62: 576–588. 1959.
25. *Bone.Q.* On the function of the two types of myotomal muscle fibre in elasmobranch fish. J. Mar. Biol. Assoc. UK. 46: 321–349. 1966. https://doi.org/10.1017/S0025315400027168
26. *Матюхин В.А., Хаскин В.В., Шошенко К.А.* Исследование энергетики движения рыб. Новосибирск. Наука. 1984. [*Matyukhin V.A., Haskin V.V., Shoshenko K.A.* Investigation of the energy of fish movement. Novosibirsk. Nauka. 1984. (In Russ)].
27. *Rome L.C., Loughna P.T., Goldspink G.* Muscle fiber recruitment as a function of swim speed and muscle temperature in carp. Am. J. Physiol. 247: 272–279. 1984. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1984.247.2.r272
28. *Jayne B.C., Lauder G.V.* How swimming fish use slow and fast muscle fibers: implications for models of vertebrate muscle recruitment. J. Compar. Physiol. 175: 123–131. 1994. https://doi.org/10.1007/BF00217443
29. *Вракин В.Ф., Сидорова М.В., Панов В.П.* Сезонные изменения и половые различия морфологического состава тела рыб некоторых видов семейства карповых. Известия ТСХА. 3: 136–145. 1981. [*Vrakin V.F., Sidorova M.V., Panov V.P.* Seasonal changes and sexual differences in the morphological body composition of fish species of the carp family. Izvestiya TSHA. 3: 136–145. 1981. (In Russ)].
30. *Панов В.П.* Некоторые особенности распределения красных мышц в теле карповых рыб. Интенсификация прудового рыбоводства. Сб. научн. трудов. Москва. 121–125. 1982. [*Panov V.P.* Some features of the distribution of red muscles in the body of cyprinids. Intensification of pond fish farming. Collected papers. Moscow. 121–125. 1982. (In Russ)].
31. *Pankhurst N.W.* Changes in body musculature with sexual maturation in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). J. Fish Biol. 21: 417–428. 1982. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1982.tb02847.x
32. *Литвер Г.М.* Строение скелетных мышц в связи с их физиологическими особенностями. Архив анат., гистол. и эмбриол. 33(11): 10–17. 1956. [*Litver G.M.* Structure of skeletal muscles in connection with their physiological features. Arch. Anat, Histol. Embryol. 33(11): 10–17. 1956. (In Russ)].
33. *Сидорова М.В., Панов В.П.* Сезонные изменения и половые различия в гистологическом строении мышц некоторых видов рыб семейства карповых. Известия ТСХА. 1: 159–168. 1982. [*Sidorova M.V., Panov V.P.* Seasonal changes and sex differences in the histological structure of the muscles of some species of fish of the carp family. Izvestiya TSHA. 1: 159–168. 1982. (In Russ)].
34. *Панов В.П., Смирнов А.Н.* Гистологическое строение осевой мускулатуры ротана (*Perccottus glehni* Dybowski, 1877). Известия ТСХА. 3: 191–201. 1996. [*Panov V.P., Smirnov A.N.* The histological structure of the axial muscles of the Amur sleeper (*Perccottus glehni* Dybowski, 1877). Izvestiya TSHA. 3: 191-201. 1996. (In Russ)].
35. *Greer-Walker M., Pull G.M.* A survey of red and white muscle in marine fish. J. Fish Biol. 7: 295–300. 1975. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1975.tb04602.x
36. *Panov V.P., Falii S.S., Orlov A.M., Artemenkov D.V.* Histostructure of the locomotor apparatus in the three deep-water species of lanternfishes (Myctophidae): *Myctophum punctatum, Notoscopelus kroyeri* and *Lampanytus macdonaldi*. J. Ichthyol. 59(6): 928–937. 2019. https://doi.org/10.1134/S0032945219060092
37. *Manual for the International Deep Pelagic Ecosystem Survey in the Inninger Sea and Adjacent Waters*. Series of ICES Survey Protocols SISP 11. IDEEPS VI. ICES. 2015.
38. *Аппельт Г.* Введение в методы микроскопического исследования. М. МЕДГИЗ. 1959. [*Appelt G.* Introduction to methods of microscopic examination. M. MEDGIZ. 1959. (In Russ)].
39. *Автандилов Г.Г.* Морфометрия в патологии. М. Медицина. 1973. [*Avtandilov G.G.* Morphometry in Pathology. M. Medicine. 1973. (In Russ)].

40. *Johnston I.A., Moon T.W.* Fine structure and metabolism of multiply innervated fast muscle fibres in teleost fish. Cell Tissue Res. 219: 93–109. 1981. https://doi.org/10.1007/BF00210021
41. *Johnston I.A., Bernard L.M.* Ultrastructure and metabolism of skeletal muscle fibres in the tench: Effects of long-term acclimation to hypoxia. Cell Tissue Res. 227: 179–199. 1982. https://doi.org/10.1007/BF00206340
42. *Sanger A.M., Kim Z.S., Adam H.* The fine structure of muscle fibres of roach, *Rutilus rutilus* (L), and chub, *Leuciscus cephalus* (L.), Cyprinidae, Teleostei: interspecific differences and effects of habitat and season. J. Fish Biol. 36: 205–213. 1990. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb05596.x
43. *Smialowska E., Kilarski W.* Histological analysis of fibers myotomes of Antarctic fish (Admiralty Bay, King George Island, South Shetland Island) I. Comparative analisis of muscle fiber size. Pol. Polar Res. 2: 109–129. 1981.
44. *Davison W., Macdonald J.F.* A histochemical study of swimming musculature of Antarctic fish. New Zealand J. Zool. 12: 473–483. 1985. https://doi.org/10.1080/03014223.1985.10428299
45. *Dunn J.E., Archer S.D., Johnston I.A.* Muscle Fibre Types and Metabolism in Post-Larval and Adult Stages of Notothenioid. Polar Biol. 9: 213–223. 1989. https://doi.org/10.1007/BF00263769
46. *Battram J.C., Johnston I.A.* Muscle growth in the Antarctic teleost *Notothenia neglecta* (Nybelin). Antarct. Sci. 3: 29–33. 1991. https://doi.org/10.1017/S0954102091000068
47. *Archer S.D., Johnston I.A.* Kinematics of labriform and subcarangiform swimming in the Antarctic fish *Notothenia neglecta*. J. Exp. Biol. 143: 195–210. 1989.
48. *Brien K.M., Skilbeck C., Sidell B.D., Egginton S.* Muscle fine structure may maintain of oxidative fibres in haemoglobinless Antarctic fishes. J. Exp. Biol. 206: 411–421. 2003. https://doi.org/10.1242/jeb.00088
49. *Gill H.S., Weatherley A.H., Bresania T.* Histochemical characterization of myotomal muscle in the bluntnose minnow, *Pimephales notatus* Rafinesque. J. Fish Biol. 21: 205–214. 1982. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1982.tb04000.x
50. *Davison W.* The lateral musculature of the common bully, *Gobiomorphus cotidianus*, a freshwater fish from New Zealand. J. Fish Biol. 23: 143–151. 1983. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1983.tb02889.x
51. *Weatherley A.H., Gill H.S.* Growth dynamics of white myotomal muscle fibres in the bluntnose minnow, *Pimephales notatus* Rafinesque, and comparison with rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 25: 13–24. 1984. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04846.x
52. *Gatz Jr. A.J.* Speed, Stamina, and Muscles in Fishes. J. Fish Res. Board Can. 30: 325–328. 1973.
53. *Egginton S., Johnston I.A.* Effects of acclimation temperature on routine metabolism muscle mitochondrial volume density and capillary supply in the elver (*Anguilla anguilla* L.). J. Thermal Biol. 9(3): 165–170. 1984. https://doi.org/10.1016/0306-4565(84)90016-0
54. *Egginton S., Sidell B.D.* Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. Am. J. Physiol. 256(1): 1–9. 1989. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.256.1.r1
55. *Rodnick K.J., Sidell B.D.* Structural and biochemical analyses of cardiac ventricular enlargement in cold-acclimated striped bass. Am. J. Physiol. 273: 252–258. 1997. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.1.R252
56. *Fitch N.A., Johnson I.A., Wood R.E.* Skeletal muscle capillary supply in a fish that lacks respiratory pigments. Resp. Physiol. 57: 201–211. 1984. https://doi.org/10.1016/0034-5687(84)90093-8
57. *Archer S.D., Johnston I.A.* Density of cristae and distribution of mitochondria in the slow muscle fibres of Antarctic fish. Physiol. Zool. 64: 242–258. 1991.
58. *Johnston I.A., Calvo J., Guderley H., Fernandes D., Palmer L.* Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fish. J. Exp. Biol. 201: 1–12. 1998.
59. *Stickland N.C.* Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Anat. 137: 323–333. 1983. PMCID: PMC1171824
60. *Kiessling A., Storebakkenc T., Asgard T., Kiessling K.-H.* Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age I. Growth dynamics. Aquaculture. 93: 335–356. 1991. https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90226-W
61. *Abdel I., Lopez-Albors O., Ayala M.D., Garcıa-Alcazar A., Abellan E., Latorre R., Gil F.* Muscle Cellularity at Cranial and Caudal Levels of the Trunk Musculature of Commercial Size Sea

Bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Anat. Histol. Embryol. 34: 280–285. 2005. https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2005.00613.x
62. *Johnston I.A., Ward P.S., Goldspink G.J.* Studies on the swimming musculature of the rainbow trout I. Fibre types. J. Fish Biol. 7: 451–458. 1975. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1975.tb04620.x
63. *Totland G.K., Kryvi H., Jodestol K.A., Christiansen E.N., Tangeras A., Slinde E.* Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) during long-term sustained swimming. Aquaculture. 66: 299–313. 1987. https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90115-3

Development of Axial Locomotor Musculation of Beaked Redfish *Sebastes mentella* (Sebastidae)

V. P. Panov[a, *], S. S. Safonova[a], A. M. Orlov[b, c, d, e, f, g], A. Yu. Rolskii[h, i], and D. V. Artemenkov[c]

[a] *Russian State Agrarian University – Timiryazev Moscow Agricultural Academy, Moscow, Russia*
[b] *Shirshov Institute of Oceanology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*
[c] *Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO), Moscow, Russia*
[d] *Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow, Russia*
[e] *Dagestan State University, Makhachkala, Russia*
[f] *Caspian Institute of Biological Resources, Makhachkala, Russia*
[g] *Tomsk State University, Tomsk, Russia*
[h] *Polar Branch VNIRO (Knipovich PINRO), Murmansk, Russia*
[i] *Murmansk State Technical University, Murmansk, Russia*
**e-mail: panovval@gmail.com*

The results of the study of the histological structure of the locomotor axial (skeletal) muscle tissue of the beaked redfish *Sebastes mentella* are presented and its ontogenetic changes are considered. Its skeletal muscles compose of glycolytic (white) and oxidative (red) fibers. Data show the quantitative distribution of these fibers along the body of sexually mature fish in the cranio-caudal direction, their ratio in the trunk and tail parts. The diameter of these two types of fibers reaches significant sizes, as in a number of deep-sea slow-growing species (>300 μm – white fibers, >150 μm – red fibers). The density of glycolytic fibers is higher than that of red ones (80.7 ± 2.0 versus 54.7 ± 1.5%), which is due to the different content of adipose and connective tissue (endomysium). The variability of white fibers in most fish size groups is significantly lower than that of red ones. A feature that is not noted in other deep-sea fish species with a low growth rate is the relatively frequent occurrence of red fibers with stratification of sarcoplasm into two zones (layers) – external and internal ("double" structures), the nature of which is not yet clear.

Keywords: beaked redfish *Sebastes mentella*, white and red muscles, diameter, distribution of muscle fibers

ЦИТИРОВАТЬ:

Панов В.П., Сафонова С.С., Орлов А.М., Рольский А.Ю., Артеменков Д.В. Развитие осевой локомоторной мускулатуры у половозрелого окуня–клювача *Sebastes mentella* (Sebastidae). Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(2): 203–220. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020059

TO CITE THIS ARTICLE:

Panova V.P., Safonova S.S., Orlov A.M., Rolskii A.Yu., Artemenkovc D.V. Development of axial locomotor musculation of beaked redfish *Sebastes mentella* (Sebastidae). Russian Journal of Physiology. 107(2): 203–220. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020059

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 2, с. 221–231

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

AGE-RELATED CHANGES OF VOLUNTARY ATTENTION PROCESS

© 2021 A. A. Tumanian[1, *], N. E. Tadevosyan[1], A. S. Khachunts[1], I. G. Tadevosyan[1], E. G. Kostanyan[1], and Z. H. Haji Beygi[1]

[1] *Orbeli Institute of Physiology NAS RA, Yerevan, Armenia*
**E-mail: tumanyanaa@mail.ru*

Received June 23, 2020
Revised November 17, 2020
Accepted December 16, 2020

The article covers the study of voluntary attention process considering age-related features of the subjects. In many studies, cognitive functions were mostly studied in two age groups – in the younger and the older subjects. In this study, changes in the voluntary attention process were studied in a wide age range (18–65 years), making it possible to trace their dynamics. The characteristics of voluntary attention were assessed using the "Clocks Carrousel" psychophysiological test, developed by analogy with the d2 Test in four age groups (the 1st group – 18–21 years old, the 2nd group – 22–35 years old, the 3rd group – 36–55 years old, the 4th group – 56–65 years old). The psychological state of all participants was assessed as stable based on results in Taylor Manifest Anxiety Scale and Pichot Inventory tests. The study of physiological state, by estimating heart rate (HR) and blood pressure (BP), showed that HR and BP were in age norm within all age groups. According to the psychophysiological study results, the highest level of voluntary attention, i.e., high speed of information processing, high concentration, and attention productivity, was found in the 1st group. The 1st group, in comparison with the other groups, spent less time on processing each symbol. A decrease in the level of attention was observed in the 2nd group. In the 3rd group, a tendency to its further decline was indicated. However, a more expressed decrease in the attention level was revealed in the 4th group compared to the 1st and 2nd groups. It should be noted that no significant differences were shown in the parameters of voluntary attention between the subjects of the 3rd and the 4th groups. We suppose that the revealed age-related changes in voluntary attention are due to the perception process impairment and a general slowing of information processing. At the same time, the older groups' subjects probably possess some degree of "latent reserve" that can be activated by spending additional time and energy.

Keywords: voluntary attention, speed of information processing, psychological state, age group

DOI: 10.31857/S0869813921020084

Cognitive functioning refers to multiple mental abilities, including learning, thinking, reasoning, remembering, problem-solving, decision making, and attention [1]. Cognitive decline with aging can be explained by the Inhibitory Deficit Hypothesis, according to which older adults are more susceptible to irrelevant stimuli and face more difficulties in inhibiting distractions as compared to the younger population, resulting in heightened distractibility, poorer retrieval of task-relevant details, and overall worsened task performance [2].

Attention and speed of information processing are involved in virtually all cognitive domains. These functions are essential for the effective performance of higher-level everyday cognitive tasks such as decision-making, problem-solving, and the planning of goal-direct-

ed behaviors [3]. Visual attention and information processing are particularly relevant to the study of cognitive decline as most human behavior is visually driven. Studies have shown that the older adults are slower and less accurate on visual tasks performance (e.g., efficient visual-search tasks) reliant on bottom-up control of attention, i.e., inhibition of distractors and are driven by salient differences among the features of the stimuli, even when tested under best-corrected conditions (i.e., with glasses) [2]. Cognitive-aging research has also reported an age-related decline in top-down control of attention relating to the idea of age-related decline in executive processing. Executive function is a key component of attention and is defined as processes involved in maintaining and updating information in working memory. The impairment of executive function is one of the key contributors to age-related declines in a range of cognitive tasks [3, 4]. Older adults' decreased performance in visual-search tasks is not entirely due to bottom-up processing and includes some decline in top-down attentional control [4].

On the other hand, when some visual tasks (e.g., inefficient visual-search tasks) require the different forms of top-down control of attention, which are facilitated by advanced knowledge of the target-defining feature, individual's internal valuations, goals, or perceptual-sets, older adults perform as fast and as accurately as younger adults [2]. Older adults often have less activity in the occipital lobe mediating the visual processing, reflecting an age-related decline in the bottom-up sensory input quality. In response to altered function in some brain regions, older adults typically overrecruit other brain areas, mainly the frontal and parietal areas, during tasks engaging cognitive control processes, such as attention. Increased frontoparietal activation represents an increase in the role of top-down attentional control. This over-recruitment may be a compensatory response to a decline in the bottom-up input from sensory pathways in the older adults [4, 5]. Normally aging older adults often utilize different brain areas and functional brain networks than young people do when performing the same cognitive tasks. In some cases, this differential brain activity in older adults has been accompanied by equivalent cognitive performance to that seen in the young subjects, suggesting that greater reliance on this brain region is related in some way to the maintained ability of the older individuals to perform the task [6].

The study of cognitive processes, in particular attentional processes, depending on age-related changes is essential for assessing the general psychophysiological state and older adult's ability to function efficiently [7]. Works are known, where a comparative study of cognitive processes was carried out only in the young and the older groups of subjects, which did not give an idea of the age dynamics of cognitive functions [2, 8–11].

Thus in this study, age-related changes in cognitive processes were considered in four age groups of subjects (age from 18 to 65 years old), which made it possible to trace their dynamics. The study of the voluntary attention process comparing quantitative, temporal, and qualitative characteristics of attention made it possible to get a more precise and more complete idea of age-related voluntary attention changes.

Thus the current study aimed at comparing the quantitative, temporal, and qualitative characteristics of voluntary attention in different age groups, using the computerized psychophysiological test while assessing psychological state.

METHODS

Participants

We studied 72 healthy volunteers divided into four age groups according to the Scheme of age periodization of human ontogenesis (adopted at the 7th All-Union Conference on the Problems of Age Morphology, Physiology, and Biochemistry, APS USSR, Moscow) [12]. The 1st group included 22 subjects [mean age ± SD (min-max): 19.7 ± 1.3 (18–21) years, 13 men and 9 women], the 2nd group included 20 subjects [25.7 ± 3.7 (22–35) years, 7 men and 13 women], the 3rd group included 17 subjects [46.9 ± 4.9 (36–55) years, 6 men and

11 women], the 4th group included 13 subjects [62.4 ± 2.8 (56–65) years, 7 men and 6 women]. All participants had normal or corrected to normal vision and were right-handed, with no history of neurological or psychiatric episodes. None of the subjects were on medication or suffered from chronic or acute disease. The study was operated in accordance with the World Medical Association's Declaration of Helsinki. All participants provided written and informed consent before enrollment.

Psychological Test

The adapted psychological computerized tests (Taylor Manifest Anxiety Scale (TMAS) and Pichot Inventory) were used to study the psychological state [13].

Taylor Manifest Anxiety Scale (TMAS)

TMAS is a self-report measure designed to assess anxiety level and consists of 50 items, each requiring a "yes" or "no" answer. True-false responses are used for each item, and the replies indicating anxiety are counted, giving a score from 0 to 50, with higher scores representing a higher level of anxiety. It takes about 10–15 minutes to complete the test. Norms: 41–50 scores – very high level of anxiety, 26–40 scores – high level of anxiety, 16–25 scores – the average level of anxiety (with a tendency to high level), 6–15 scores – the average level of anxiety (with a tendency to low level), 0–5 scores – low level of anxiety [14].

Pichot Inventory

Pichot inventory is a self-rating inventory of 39 items that includes three subscales of 13 items each, measuring 3 aspects of mood (depression, asthenia, and hypochondria). True-false responses are used for each item, and the replies indicating depression, asthenia, and hypochondria are counted, giving a score from 0 to 100 with higher scores representing more negative mood. It takes about 10–15 minutes to complete the test. Norms: 71–100 scores – high level of depression, asthenia, and hypochondria, 31–70 scores – the average level of depression, asthenia, and hypochondria, 0–30 scores – low level of depression, asthenia, and hypochondria [15].

Psychophysiological Test

For the cognitive assessment, all individuals performed the psychophysiological test. The test was duly explained to the subjects, and sufficient trials were given for proper understanding. The computerized psychophysiological test using custom software "Clocks Carrousel" was used to study voluntary attention, in particular selective attention [16]. This test was developed by analogy with the d2 Test by incorporating some modifications [17]. In "Clocks Carrousel," stimuli were presented by rings similar to the clock dial without numerals and with only hour hand (all hours besides 3, 6, 9, and 12) arranged in a circle in the center of the display (as opposed to characters arranged in lines in d2 Test). The display size was 19" (width × height: 16.56" × 9.31"), the diameter of each stimulus was 2.2 cm, and the diameter of the circle was 19.3 cm. The sequence of stimuli changed automatically before 10% of the completion of the circle. Stimuli were divided into two groups – control symbols (clock dial with the hour hand pointing at 5 and 10) and ordinary symbols (clock dial with the hour hand pointing at 1, 2, 4, 7, 8, and 11) (See fig.1).

The subjects were at a distance of 60–70 cm from the display. The subjects were instructed to pass from symbol to symbol by pressing the cursor control key, thus fixing each symbol's processing time and press the spacebar immediately when they saw the control symbol on the screen and omit the ordinary symbol while keeping the index finger on the spacebar. The fixed duration of the test was 10 minutes. All correctly clicked (choice of

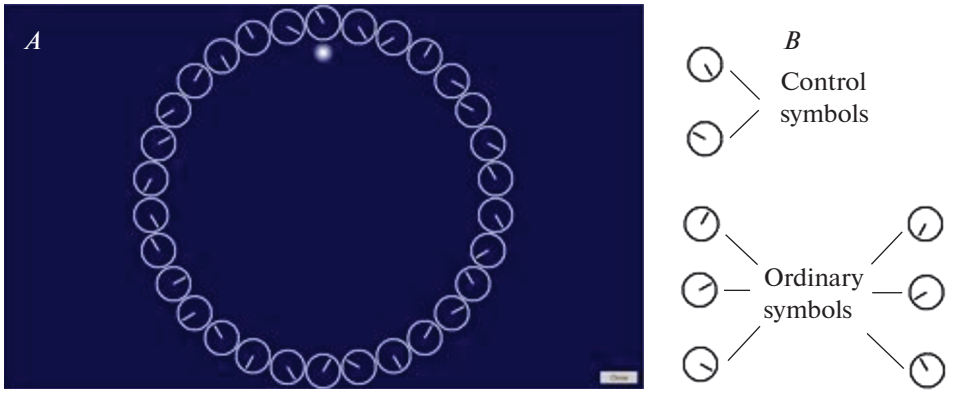

Fig. 1. *A* – Screenshot of the working window of the psychophysiological test "Clocks Carrousel." *B* – Control and ordinary symbols.

control symbols) and correctly missed symbols (omission of ordinary symbols) were considered as right responses. The incorrectly missed (omission of control symbols) and incorrectly clicked symbols (choice of ordinary symbols) were considered as errors.

The quantitative, qualitative, and temporal characteristics of voluntary attention were assessed. The quantitative parameters of the test are: TNS – total number of symbols (the number of symbols watched in ten minutes); NWS/min – number of watched symbols per minute; IMS – number of incorrectly missed symbols; ICS – number of incorrectly clicked symbols; TNE – total number of errors (ICS + IMS); TNRR – total number of right responses (TNS-TNE). In this article, the percentage of IMS, ICS, TNE, and TNRR parameters from TNS was calculated and studied (IMS%, ICS%, TNE%, and TNRR%, respectively). The qualitative parameters of the test are: CI – concentration index (CCS-ICS, where CCS is number of correctly clicked symbols); AP/min – attention productivity per minute (TNS*(CCS/(CCS + IMS)) [18, 19]. Time parameters were also studied: CCS_pt – correctly clicked symbols processing time (msec); CMS_pt – correctly missed symbols processing time (msec); IMS_pt – incorrectly missed symbols processing time (msec); ICS_pt – incorrectly clicked symbols processing time (msec).

Study Procedure

For comparability of the results, the study was carried out at the same time (at 11.00 h) in a quiet room. At first, all participants completed TMAS and Pichot inventory. Then they took the Psychophysiological test. Before starting the psychological and psychophysiological tests, all participants' pulse and blood pressure (BP) were measured in the sitting position. The pulse was measured by palpation on A. radialis in one minute. BP was measured three times by Automatic Blood Pressure Monitor (Omron M6). The device also gave out the pulse value. The average value of three measurements of pulse and BP was calculated. Pulse results were generally comparable.

The psychological characteristics and HR and BP parameters were considered to assess the subjects' general psychological and physiological states. Subjects with high severity of psychological characteristics and high values of pulse and BP (over the age norm) were excluded from the study.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± *SD*. The normality of the data and the homogeneity of variance were determined by the Shapiro–Wilk test and the Levene's test, respectively. Comparisons of age-dependent changes of characteristics of voluntary attention (total number of symbols, number of watched symbols per minute, number of incorrectly missed symbols, number of incorrectly clicked symbols, the total number of errors, total number of right responses, concentration index, attention productivity per minute, correctly clicked symbols processing time, correctly missed symbols processing time, incorrectly omitted symbols processing time, incorrectly clicked symbols processing time) were performed using the One-Way ANOVA for Gaussian distribution and the homogeneity of variance. When the ANOVA indicated significant age effects, significant differences between means were tested applying post hoc analysis with the Bonferroni correction. Kruskal–Wallis H-test was applied for Gaussian approximation, and Mann–Whitney posthoc test was used when necessary to evaluate significant interactions. A significant difference was indicated by $p < 0.05$. All statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 software and SPSS (Version 16.0 for Windows).

RESULTS

Assessment of TMAS and Pichot inventory

The TMAS and Pichot inventory results are presented in Table 1.

There were no significant differences in the level of anxiety and hypochondria between the groups ($F_{3, 68} = 0.68$, $p > 0.05$ for anxiety and $\chi^2 = 0.69$, $p > 0.05$ for hypochondria). Most of the subjects in the groups had an average level of anxiety with tend to the high level and the low level of hypochondria. The Kruskal–Wallis H-test and ANOVA revealed significant age effect for depression and asthenia ($\chi^2 = 9.38$, $p < 0.05$ for depression and $F_{3, 68} = 7.47$, $p < 0.001$ for asthenia). Post-hoc tests showed that the level of depression and asthenia was significantly higher in the 3rd and the 4th groups than the 2nd group. The 4th group also had a higher level of depression than the 1st group. There were no other differences in the level of depression and asthenia between the groups. So the 1st and 2nd groups had low levels, and the 3rd and the 4th groups had an average level of depression and asthenia.

Table 1. Results of TMAS, Pichot inventory, pulse and blood pressure of the study groups

Parameter	Group			
	1st group (n = 22, 18–21 y.o.)	2nd group (n = 20, 22–35 y.o.)	3rd group (n = 17, 36–55 y.o.)	4th group (n = 13, 56–65 y.o.)
Anxiety, c.u.	17.8 ± 5.9	17.0 ± 7.7	20.2 ± 7.7	17.4 ± 6.0
Depression, c.u.	19.9 ± 8.7	15.0 ± 7.9	32.3 ± 12.2$^{\#}$	34.0 ± 12.5$^{*\#\#}$
Asthenia, c.u.	28.6 ± 10.5	17.6 ± 7.7	40.4 ± 14.3$^{\#\#\#}$	43.9 ± 16.8$^{\#\#}$
Hypochondria, c.u.	15.6 ± 6.8	12.1 ± 6.1	15.9 ± 8.8	13.1 ± 6.5
HR, bpm	71.6 ± 8.4	77.8 ± 7.6	80.5 ± 9.6*	73.6 ± 9.9
SBP, mm Hg	110.2 ± 13.2	105.8 ± 11.9	105.1 ± 11.6	126.4 ± 10.4$^{\#\Delta}$
DBP, mm Hg	72.1 ± 10.0	66.8 ± 8.9	67.9 ± 11.4	83.0 ± 5.7$^{\#\Delta}$

Data are reported as Mean ± SD; * Significant difference in comparison with the 1st group; # Significant difference in comparison with the 2nd group; Δ Significant difference in comparison with the 3rd group; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$. HR: heart rate; SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure.

Assessment of pulse and blood pressure

Table 1 also shows the pulse and blood pressure parameters of subjects included in this study. The ANOVA indicated significant age effect for pulse and blood pressure ($F_{3, 68} = 3.85$, $p < 0.05$ for HR, $F_{3, 68} = 1.92$, $p < 0.05$ for SP and $F_{3, 68} = 1.46$, $p < 0.05$ for DP). Post-hoc analysis revealed that HR was significantly higher in the 3rd group compared to the 1st group. The SBP and DBP were significantly higher in the 4th group than in the 2nd and the 3rd groups. No other differences in HR, SBP and DBP were observed between the groups.

Psychophysiological study

The results of the psychophysiological study are summarized in Table 2.

The ANOVA revealed a main effect of age for TNS and NWS/min ($F_{3, 68} = 26.45$, $p < 0.001$ for TNS and $F_{3, 68} = 12.57$, $p < 0.001$ for NWS/min). The TNS and NWS/min were significantly more in the 1st group compared to the other groups. The 4th group also had less TNS and NWS/min than the 2nd group. There were no other differences in these parameters between the groups. There were no effects of age for TNRR% ($\chi^2 = 6.33$, $p > 0.05$). A further analysis showed significant differences in the TNE% and IMS% between the study groups ($F_{3, 68} = 4.59$, $p < 0.01$ for TNE% and $F_{3, 68} = 6.13$, $p < 0.001$ for IMS%). Post-hoc analysis showed that the 1st group had significantly more TNE% and IMS% than the 3rd and 4th groups. No other differences in these parameters were found between the groups. There were no significant differences in the ICS% between the groups ($\chi^2 = 3.50$, $p > 0.05$). The ANOVA indicated significant age effect for CI and AP/min ($F = 7.40$, $p < 0.001$ for CI and $F_{3, 68} = 8.83$, $p < 0.001$ for AP/min). Table 2 shows that CI and AP/min were significantly more in the 1st group than in the other groups. The 2nd group also had more CI and AP/min compared with the 4th group. No other differences in CI and AP/min were revealed between groups.

Table 2. Results of Psychophysiological test of the study groups

Parameter	Group			
	1st group (n = 22, 18–21 y.o.)	2nd group (n = 20, 22–35 y.o.)	3rd group (n = 17, 36–55 y.o.)	4th group (n = 13, 56–65 y.o.)
TNS	804.8 ± 76.5	665.0 ± 77.3***	622.6 ± 71.3***	592.1 ± 71.4***#
NWS/min	81.4 ± 12.6	67.1 ± 12.0***	62.3 ± 9.1***	60.0 ± 7.6***#
TNRR, %	94.1 ± 3.2	95.4 ± 3.8	96.2 ± 3.0	95.5 ± 2.2
TNE, %	6.0 ± 1.9	4.6 ± 1.8	3.9 ± 1.9*	4.5 ± 1.4*
IMS, %	4.8 ± 1.7	3.8 ± 1.8	2.9 ± 1.3*	3.4 ± 1.9*
ICS, %	1.2 ± 0.6	0.8 ± 0.5	1.1 ± 0.5	1.0 ± 0.4
CI, c.u.	272.8 ± 43.2	233.4 ± 39.7**	224.5 ± 36.9**	210.6 ± 30.2**#
AP/min, c.u.	70.4 ± 10.6	59.7 ± 9.5**	57.8 ± 9.0***	54.1 ± 6.9***#
CCS_pt, ms	996.3 ± 149.7	1245.1 ± 234.7***	1325.4 ± 250.3***	1319.2 ± 138.6**
CMS_pt, ms	324.3 ± 56.2	384.4 ± 65.0*	400.4 ± 60.8**	435.6 ± 90.5***
ICS_pt, ms	1190.0 ± 240.0	1647.1 ± 600.5**	1517.7 ± 463.2**	2002.0 ± 560.5***#Δ
IMS_pt, ms	586.2 ± 123.8	727.6 ± 222.9*	781.6 ± 161.2***	761.4 ± 157.3**

Data are reported as Mean ± SD; * Significant difference in comparison with the 1st group; # Significant difference in comparison with the 2nd group; Δ Significant difference in comparison with the 3rd group; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$. TNS: total number of symbols; NWS/min: number of watched symbols per minute; TNRR: total number of right responses; TNE: total number of errors; IMS: number of incorrectly missed symbols; ICS: number of incorrectly clicked symbols; CI: concentration index; AP/min: productivity of attention per minute; CCS_pt: correctly clicked symbols processing time; CMS_pt: correctly missed symbols processing time; IMS_pt: incorrectly missed symbols processing time; ICS_pt: incorrectly clicked symbols processing time.

The ANOVA and Kruskal–Wallis H-test revealed significant age effect for all time parameters ($F_{3, 68} = 10.29$, $p < 0.001$ for CCS_pt, $F_{3, 68} = 7.69$, $p < 0.001$ for CMS_pt, $\chi^2 = 18.94$, $p < 0.001$ for ICS_pt and $\chi^2 = 17.20$, $p < 0.001$ for IMS_pt). Post-hoc analysis of the processing time showed that all time parameters were markedly less in the 1st group than the other groups. The 4th group had significantly more ICS_pt than the 2nd and the 3rd groups. There were no other differences in time parameters between study groups. In all groups CCS_pt and CMS_pt were less than ICS_pt and IMS_pt, respectively.

DISCUSSION

The general psychological state assessment revealed no differences in the level of anxiety and hypochondria between the groups. Subjects of 36–65 years old had a higher level of depression and asthenia than younger subjects. Nevertheless, the severity of depression and asthenia in the 3rd and 4th groups was moderate. Our findings are inconsistent with those suggesting that older adult groups had lower levels of anxiety and depression than younger adults [20]. Personality factors are important determinants of cognitive functioning in older age. Neuroticism is one of the factors of personality structure and involves the manifestation of tension and experience of anxiety, anger, and depression. Neuroticism negatively affects cognitive functioning [21]. In our study, all subjects had low and moderate severity of psychological characteristics, i.e., the general psychological state of the subjects was assessed as a stable during the study.

The study of the physiological state by HR and BP parameters revealed a relatively high HR in the 3rd group and elevated BP in the 4th group. Despite some differences in HR and BP between groups, these parameters were within the age norm in all groups, according to [25]. It is known that resting heart rate is independently associated with cognitive decline and may be an important risk marker [22]. Studies of BP in the general population demonstrate associations between higher systolic BP and diastolic BP and cognitive impairment [23]. Midlife high BP is a well-known risk factor for cerebrovascular disease and, consequently, cognitive decline in old age. Observational studies indicate that a lower rather than a more elevated BP in old age increases the risk for cognitive decline. Lowering their BP may compromise cerebral blood flow and cognitive function [24].

It should be noted that in our study, no relationships were seen between the general psychological/physiological state and voluntary attention process in study groups. This is probably because the subjects had low and moderate severity of psychological characteristics, and HR and BP were within the age norm.

The study of the process of voluntary attention revealed some age-related changes. In the groups, the number of watched symbols, i.e., the amount of processed information and its processing speed, decreased with age, which was most expressed in the 4th group. There are data according to which processing speed peaks in the third decade of life and then begins to decline, which continues throughout the lifespan [26]. Another study has reported a continuous, regular decline in processing speed from an earlier age, beginning in the 20s, which was also observed in our work [20]. Despite the absence of differences in the number of right responses, i.e., general performance, between groups, the 3rd, and the 4th groups had fewer errors than the 1st group due to a decrease in the number of IMS. The analysis of the type of errors showed that the number of IMS in all study groups exceeded the number of ICS, regardless of age.

Significant changes in time parameters were revealed depending on age. In our study, the time for identification and differentiation of all correct and incorrect symbols increased with age, which was most expressed for ICS_pt. Age-related changes in time parameters, such as a significant increase in threshold exposure time to discriminate and identify simple visual stimuli in subjects of 60–81 age group compared with subjects of 18–29 age

group, were identified by Ebaid and colleagues [2]. At the same time, there are no data on the age dynamics of time parameters. It should be noted that in our study, changes in time parameters were observed starting from 22 years of age. According to the time parameters, subjects of all groups required more time to differentiate incorrect symbols.

Analysis of quantitative parameters revealed some increase in performance accuracy in subjects aged from 36 to 65 years (the 3rd and 4th groups) compared with subjects aged from 18–21 years (the 1st group). These differences between groups may be due to higher impulsivity in subjects of the 1st group. The results of the study of Lufi and Colleagues indicated no differences on measures of impulsivity between the two age groups (31 and 75 years old) [8]. However, in this work, characteristics of attention were not studied in subjects under 31. Some decrease in the number of errors in the 3rd and 4th groups can also be explained by the fact that the subjects of these groups spent more time identifying and comparing each symbol and had less amount of processed information and lower processing speed compared to those of each symbol with the 1st group.

The age-related changes in quantitative and time parameters described above were also expressed in the qualitative parameters – CI and AP. A gradual decrease in concentration and productivity of attention was observed with age.

Thus, the current study demonstrates that voluntary attention is the highest in the 1st group. This group exceeded other groups in the amount and speed of processed information. Besides, the 1st group required less time to identify and differentiate symbols. The 1st group showed a high level of concentration and productivity of attention, which also pointed to a high level of voluntary attention. Changes in the voluntary attention process were started to be detected in the 2nd group. Although the accuracy of performance and general performance didn't change in the 2nd group, the amount and speed of processed information significantly decreased, which was combined with an increase in the time for identification and differentiation. At the same time, the 2nd group showed a significant decrease in concentration and productivity of attention. In the 3rd group, a tendency to further decrease in the level of attention was observed. However, more expressed decline in attention level was revealed in the 4th group compared with the 1st and 2nd groups.

Interestingly, there were no significant differences in the study parameters between the 3rd and the 4th groups. The age-related impairment of voluntary attention is probably due to the perception process impairment and a general slowing of information processing. This viewpoint is also presented in the work of Glisky [3].

We suppose that the revealed age-related changes in the process of voluntary attention are a result of a decrease in functional network efficiency [27]. A reorganization of the functional and structural connectivity of the brain occurs with age. A decrease in connectivity within several cerebral networks, including the executive network, is associated with age-related cognitive decline [10]. However, age-related decline in attention is not entirely pervasive. Older adults possess some degree of "latent reserve" that can be activated by spending additional time and energy [20].

REFERENCES

1. *Fisher G.G., Chacon M., Chaffee D.S.* Work Across the Lifespan. Chapter 2 – Theories of Cognitive Aging and Work. Eds. Baltes B.B., Rudolph C.W., Zacher H. Acad. Press. 17–45. 2019. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812756-8.00002-5
2. *Ebaid D., Crewther S.G.* Visual Information Processing in Young and Older Adults. Front. Aging Neurosci. 11: 116. 2019. https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00116
3. *Glisky E.L.* Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms. Chapter 1 - Changes in Cognitive Function in Human Aging. Eds. Riddle D.R. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. 2007.

4. *Madden D.J.* Aging and Visual Attention. Curr. Dir. in Psychol. Sci. 16(2): 70–74. 2007. https://doi.org/10.1111/j.1467-8721.2007.00478.x
5. *Grady C.L.* Cognitive Neuroscience of Aging. Ann. NY Acad. Sci. 1124: 127–144. 2008. https://doi.org/10.1196/annals.1440.009
6. *Grady C.L.* Functional Brain Imaging and Age-Related Changes in Cognition. Biol. Psychol. 54(1–3): 259–281. 2000. https://doi.org/10.1016/s0301-0511(00)00059-4
7. *Touroutoglou A., Zhang J., Andreano J.M., Dickerson B.C., Feldman Barrett L.* Dissociable Effects of Aging on Salience Subnetwork Connectivity Mediate Age-Related Changes in Executive Function and Affect. Front. Aging Neurosci. 10: 410. 2018. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00410
8. *Lufi D., Segev S., Blum A., Rosen T., Haimov I.* The Effect of Age on Attention Level: A Comparison of Two Age Groups. Int. J. Aging Hum. Dev. 81(3): 176–188. 2015. https://doi.org/10.1177/0091415015614953
9. *Williams R.S., Biel A.L., Dyson B.J., Spaniol J.* Age Differences in Gain- and Loss-Motivated Attention. Brain Cogn. 111: 171–181. 2017. https://doi.org/10.1016/j.bandc.2016.12.003
10. *Ramanoël S., York E., Le Petit M., Lagrené K., Habas C., Arleo A.* Age-Related Differences in Functional and Structural Connectivity in the Spatial Navigation Brain Network. Front. Neural Circuits. 13: 69. 2019. https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00069
11. *Folville A., Bahri M.A., Delhaye E., Salmon E., D'Argembeau A., Bastin C.* Age-Related Differences in the Neural Correlates of Vivid Remembering. NeuroImage. 206: 116336. 2020. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116336
12. *Алейникова Т.В.* Возрастная психофизиология. Глава 1 – Представления о возрастной периодизации онтогенеза человека. Ростов-на Дону. УНИИ валеологии РГУ. 5–10. 2002. [*Aleinikova T.V.* Age-Specific Psychophysiology. Chapter 1 – Concepts of the Age Periodization of Human Otogenesis. Rostov-on-Don: ERI of Valueology of RSU. 5–10. 2002. (In Russ)].
13. *Геворкян Э.Г., Оганесян Н.М.* Оценка функционального состояния мозга с помощью компьютерных технологий диагностики. Мед. наука Армении. 46(1): 106–110. 2006. [*Gevorkyan E.G., Oganesyan N.M.* Assessment of the Brain Functional States with the Aid of Computer Diagnostic Technologies. Med. Sci. Armenia. 46(1): 106–110. 2006. (In Russ)].
14. *Дерманова И.Б.* Личностная шкала проявлений тревоги (Тейлор Дж., адаптация Немчина Т.А.). Диагностика эмоционально-нравственного развития. Ред. и сост. Дерманова И.Б. 26–128. 2002. [*Dermanova I.B.* Personal Scale of Manifestations of Anxiety (Taylor J., adaptation of Nemchin T.A.). Diagnostics of emotional-moral development. Ed. Dermanova I.B. St. Petersburg. Rech. 126–128. 2002. (In Russ)].
15. *Нафтульева А.И.* Психологическое тестирование: тесты (Пишо П., пер. с фр. Кружилина И.). Науч. ред. пер. на рус. яз. Нафтульева А.И. СПб. Питер. 2003. [*Naftuleva A.I.* Psychological Testing: tests (Pichot P., transl. from French Kruzhilina I.). Ed. Naftuleva A.I. SPb. Piter. 2003. (In Russ)].
16. *Gevorkyan E.G.* About Short-Term Fluctuations of Functional Activity of Human Brain. Materials of the Conference "The Modern Problems of Integrative Activity and Plasticity of the Nervous System". 98–102. 2009.
17. *Brickenkamp R.* Test d2, Aufmerksamkeits-Belastungs-Test. Handanweisung. 8th expanded and revised edition. Göttingen. Germany. Hogrefe. 1994.
18. *Brickenkamp R.* d2, Test de Atención: Manual. Adaptación española: Nicolas Seisdedos Cubero. 4ed. Madrid: TEA Ediciones, S.A.U. 2012. I.S.B.N.:978-84-15262-68-8
19. *Сидоров К.Р.* Количественная оценка продуктивности внимания в методике "Корректурная проба" Б. Бурдона. Вестн. Удмуртск. универ. 4. 50–57. 2012. [*Sidorov K.R.* Qualitative Assessment of the Efficiency of Attention in the Methodology of "Cancellation Test" by B. Bourdon. Bull. Udmurt. State Univer. 4: 50–57. 2012. (In Russ)].
20. *Anderson N.D., Craik F.I.* 50 Years of Cognitive Aging Theory. J. Gerontol. B Psychol. Sci. Soc. Sci. 72(1): 1–6. 2017. https://doi.org/10.1093/geronb/gbw108
21. *Arshad T., Kausar R., Fatima I.* Psychosocial Determinates of Cognitive Functioning in Older Adults. J. Liaquat. Uni. Med. Health Sci. 19(03): 208–214. 2020. https://doi.org/10.22442/jlumhs.201930692
22. *Leong D.P., O'Donnell M.J., Teo K., Smyth A., Joseph P., Gao P., Bohm M.J., Yusuf S.* Resting Heart Rate and Decline in Cognitive Function: Observations from the ONTARGET/TRANSCEND Studies. Europ. Heart J. 34(suppl_1, P2737): 499–500. 2013. https://doi.org/10.1093/eurheartj/eht309.P2737
23. *Drew D.A., Tighiouart H., Duncan S., Rollins J., Gupta A., Scott T., Weinea D.E., Sarnak M.J.* Blood Pressure and Cognitive Decline in Prevalent Hemodialysis Patients. Am. J. Nephrol. 49:

460–469. 2019.
https://doi.org/10.1159/000500041

24. *Moonen J.E.F., Foster-Dingley J.C., de Ruijter W.* Effect of Discontinuation of Antihypertensive Treatment in Elderly People on Cognitive Functioning—the DANTE Study Leiden: A Randomized Clinical Trial. JAMA Intern. Med. 175(10): 1622–1630. 2015.
https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.4103

25. *Lin J.-D., Chen Y.-L., Wu C.-Z., Hsieh C.-H., Pei D., Liang Y.-J., Chang J.-B.* Identification of Normal Blood Pressure in Different Age Group. Medicine (Baltimore). 95(14): e3188. 2016.
https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003188

26. *Harada C.N., Natelson Love M.C., Triebel K.L.* Normal cognitive aging. Clin. Geriatr. Med. 29(4): 737–752. 2013.
https://doi.org/10.1016/j.cger.2013.07.002

27. *Niu H., Zhu J., Wang C., Zhu L., Wu J.* Changes in White-Matter Functional Network Efficiency Across the Adult Lifespan. Neuroreport. 30(8): 600–604. 2019.
https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001255

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОЛЬНОГО ВНИМАНИЯ

А. А. Туманян[a], *, Н. Э. Тадевосян[a], А. С. Хачунц[a], И. Г. Тадевосян[a], Э. Г. Костанян[a], З. Х. Аджи Бейги[a]

[a] *Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА, Ереван, Армения*

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

В статье изложены данные, полученные при изучении процесса произвольного внимания с учетом возрастных особенностей испытуемых. Во многих работах изменения когнитивных процессов изучались, в основном, в двух возрастных группах – у молодых и пожилых испытуемых. В данном исследовании изменения процесса произвольного внимания изучались в широком возрастном диапазоне (18–65 лет), что позволяло проследить их динамику. Характеристики произвольного внимания оценивались в четырех возрастных группах (1-я группа – 18–21 года, 2-я группа – 22–35 лет, 3-я группа – 36–55 лет, 4-я группа – 56–65 лет) с использованием психофизиологического теста “Карусель часов”, разработанного по аналогии с d2 тестом. Психологическое состояние испытуемых оценивалось как стабильное на основе результатов тестов – Шкала проявлений тревоги Тейлор и опросник П. Пишо. Изучение физиологического состояния с оценкой показателей частоты сердечных сокращений (ЧСС) и артериального давления (АД) показало, что значения ЧСС и АД во всех группах были в пределах возрастной нормы. Согласно результатам психофизиологического исследования, наиболее высокий уровень произвольного внимания, то есть высокая скорость обработки информации, высокая концентрация и продуктивность внимания, выявлен у 1-й группы. 1-я группа, по сравнению с остальными группами, потратила меньше времени на обработку каждого символа. Снижение уровня внимания наблюдалось уже у 2-й группы. У 3-й группы отмечалась тенденция его дальнейшего снижения. Однако наиболее выраженное снижение уровня внимания обнаружено у 4-й группы по сравнению с 1-й и 2-й группами. Следует отметить, что между испытуемыми 3-й и 4-й групп в показателях произвольного внимания существенных различий не наблюдалось. Полагаем, что выявленные возрастные изменения процесса произвольного внимания являются результатом ухудшения процесса восприятия и общего замедления скорости обработки информации. В то же время испытуемые старших возрастных групп, вероятно, обладают некоторой степенью “скрытого резерва”, который можно задействовать, потратив дополнительное время и энергию.

Ключевые слова: произвольное внимание, скорость обработки информации, психологическое состояние, возрастная группа

TO CITE THIS ARTICLE:

Tumanian A.A., Tadevosyan N.E., Khachunts A.S., Tadevosyan I.G., Kostanyan E.G., Haji Beygi Z.H. Age-related changes of voluntary attention process. Russian Journal of Physiology. 107(2): 221–231. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020084

ЦИТИРОВАТЬ:

Туманян А.А., Тадевосян Н.Э., Хачунц А.С., Тадевосян И.Г., Костанян Э.Г., Аджи Бейги З.Х. Возрастные изменения процесса произвольного внимания Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(2): 221–231. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020084

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 2, с. 232–242

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ГИППОКАМПЕ И ЛОБНОЙ КОРЕ У КРЫС ЛИНИИ ГК С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КАТАТОНИЕЙ

© 2021 г. В. С. Плеканчук[1, 2, *], М. А. Рязанова[1]

[1]Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

[2]Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*****E-mail: lada9604@mail.ru*

Поступила в редакцию 21.10.2020 г.
После доработки 25.11.2020 г.
Принята к публикации 04.12.2020 г.

Линия крыс ГК (аббревиатура от слов “генетическая” и “кататония”) была получена в Институте цитологии и генетики СО РАН путем селекции на усиление реакции пассивно-оборонительного застывания в ответ на слабый стрессорный стимул. Крысы линии ГК имеют предрасположенность к кататоническим реакциям, а также ряд поведенческих и биохимических особенностей, соответствующих аналогичным характеристикам больных при шизофрении и депрессии. В основе кататонического синдрома, как и при шизофрении, предполагают наличие комплексного нарушения в работе нейротрансмиттерных систем мозга, при этом в последнее время особое внимание уделяется дисфункции глутаматергической системы мозга, в рамках развития глутаматной гипотезы психопатологий. Глутамат является главным возбуждающим медиатором в ЦНС и опосредует свои физиологические эффекты через ионотропные (AMPA-, NMDA-, каинатные) и метаботропные (mGlu) глутаматные рецепторы. Есть множество исследований, указывающих на изменение экспрессии генов рецепторов глутамата и состава их субъединиц при шизофрении и биполярных расстройствах, а также указывающих на вовлеченность NMDA-рецепторов глутамата в проявление кататонического синдрома. В связи с этим целью работы было исследование экспрессии генов глутаматной системы в гиппокампе и лобной коре крыс линии ГК с генетической кататонией. Методом ПЦР в реальном времени показана низкая экспрессия гена *Grm3*, кодирующего метаботропный глутаматный ауторецептор, в гиппокампе крыс с генетической кататонией. Экспрессия генов *Grin1*, *Grin2A*, *Grin2B*, *Gria1*, *Grm2*, *Slc17a6* в лобной коре и гиппокампе, а также гена *Grm3* в лобной коре не отличалась от контроля. Таким образом, выявленная низкая экспрессия мРНК гена *Grm3* в гиппокампе может влиять на нейротрансмиссию глутамата в этой структуре, и в том числе, способствовать повышению нервной возбудимости у крыс линии ГК.

Ключевые слова: глутаматергические рецепторы, *Grm3*, везикулярный транспортер глутамата, гиппокамп, лобная кора, кататония, крысы линии ГК, ПЦР в реальном времени

DOI: 10.31857/S0869813921020060

Линия крыс ГК (аббревиатура от слов “генетическая” и “кататония”) получена путем селекции на усиление реакции пассивно-оборонительного застывания в ответ на слабый стрессорный стимул [1]. Крысы этой линии имеют ряд поведенче-

ских и биохимических особенностей, соответствующих клиническим проявлениям у больных шизофренией и депрессией [2, 3]. В частности, отмечаются застывания и гиперкинетические поведенческие реакции, что сходно с проявлением кататонического синдрома, который наблюдается у больных шизофренией кататонического типа [4], биполярных расстройствах [5] и других заболеваниях. В основе кататонического синдрома, как предполагают, лежат комплексные нарушения функции нейротрансмиттерных систем мозга, включая глутаматергическую, дофаминергическую и норадренергическую [6]. В этиологию кататонии, по-видимому, вовлечена дисфункция ряда структур мозга, связанных с двигательной активностью, а также лобная кора, структуры лимбической системы (в том числе гиппокамп), промежуточный мозг и базальные ганглии, однако точный механизм этих дисфункций неизвестен [6]. В последнее время особое значение в развитии кататонии и шизофрении уделяют глутаматергической системе мозга, предлагая глутаматную гипотезу психопатологий [7, 8]. Глутамат является главным возбуждающим медиатором в ЦНС и опосредует свои физиологические эффекты через ионотропные (AMPA-, NMDA-, каинатные) и метаботропные (mGlu) глутаматные рецепторы. На сегодняшний день получены данные об изменении экспрессии генов субъединиц рецепторов глутамата при шизофрении и биполярных расстройствах. Так, показано снижение количества мРНК *GRIN1* и *GRIA1* во фронтальной коре у людей с шизофренией [9]; снижение экспрессии генов *GRIN1*, *GRIN2A* в гиппокампе людей с биполярными расстройствами, шизофренией и депрессией [10, 11]. Кроме того, сообщается о положительных генетических ассоциациях между полиморфизмами генов *GRIN1*, *GRIN2B* и шизофренией [12, 13], а в некоторых случаях была показана связь NMDA-рецепторов с проявлением кататонического синдрома [14, 15], что указывает на важную роль рецепторов глутамата и их субъединиц в проявлении кататонии и шизофрении. Метаботропные рецепторы глутамата группы II (mGluR) включают mGluR2 и mGluR3 и также представляют интерес при исследовании генетико-физиологических механизмов шизофрении, так как *GRM3* может быть геном восприимчивости к шизофрении; экспрессия mGluR3 изменяется в головном мозге при шизофрении; и клинические испытания агониста mGluR группы II имели положительный антипсихотический эффект [16].

Кроме того, все перечисленные гены рецепторов входят в базу данных RGD (Rat Genome Database) в качестве генов, связанных с шизофренией и психопатологиями.

Транспорт глутамата важен для нормального функционирования нервной системы и осуществляется специальными везикулярными транспортерами глутамата – VGLUT [17]. Условный нокаут гена, кодирующего переносчик глутамата, *Vglut2*, у мышей в коре, гиппокампе и миндалине приводил к увеличению двигательной активности, изменению социальной доминантности, а также нарушению долгосрочной пространственной памяти. Кроме того, у них наблюдалось изменение фильтрации сенсомоторной информации – снижение реакции престимульного торможения (prepulse inhibition – PPI) [18, 19]. Такой дефицит PPI имеется у крыс линии ГК [3] и является одним из важных индикаторов нарушения обработки сенсомоторной информации при психопатологиях, в частности, при шизофрении [20, 21]. Учитывая то, что до настоящего времени исследования глутаматной системы и, в частности, оценки транскрипционной активности генов рецепторов и переносчиков глутамата в мозге у крыс линии ГК не проводилось, данная работа представляется актуальной.

Цель работы – исследовать экспрессию генов субъединиц NR1, NR2A, NR2B глутаматных NMDA-рецепторов (гены *Grin1*, *Grin2A*, *Grin2B*), субъединицы GluR1 глутаматных AMPA-рецепторов (ген *Gria1*), метаботропных глутаматных mGlu2 и mGlu3 рецепторов и везикулярного транспортера глутамата (гены *Grm2*, *Grm3*,

Slc17a6 соответственно) в гиппокампе и лобной коре у крыс инбредной линии ГК с генетической каттонией.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

Работа выполнена на 7-месячных крысах-самцах инбредной линии ГК и WAG (Wistar Albino Glaxo), которые, как и крысы линии ГК, были получены из популяции Wistar. В каждой группе было по 6 животных. Крысы содержались в стандартных условиях вивария Института цитологии и генетики СО РАН со свободным доступом к воде и сбалансированному корму. Все опыты на животных выполнены в соответствии с порядком проведения процедур на животных согласно приказу № 755 от 12 августа 1977 г. и по международным рекомендациям (Этический кодекс от 1985 г.) и одобрены биоэтической комиссией Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 34 от 15.06.2016).

Тест на каттоническое застывание

Для определения наличия или отсутствия застывания и его продолжительности крысу за передние лапы приподнимали палочкой-тестером в углу клетки. Регистрировали время, в течение которого животное сохраняло приданную ему позу после того, как убрали палочку. Крыс тестировали 2 раза в разные дни. Данные тестирования усредняли по каждой крысе.

Оценка экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

Биологический материал (гиппокамп, лобная кора) быстро выделяли и помещали в жидкий азот, а затем хранили при – 70°С до выделения РНК. Выделение суммарной РНК из структур мозга проводилось с использованием “Три-реагент” (RNA/DNA/Protein isolation agent, Molecular research center, США) согласно рекомендациям производителя. Примеси геномной ДНК удаляли с помощью ДНКазы (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию РНК измеряли в водном растворе с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США) по поглощению при длине волны 260 нм. Качественными считали образцы РНК, для которых D260/D280 ≈2.0. Для получения кДНК смешивали 3 мкг РНК и 0.25 нмоль “случайных” (random N9) праймеров-наномеров (Биосинтез, Россия). Конечный раствор смеси реакции обратной транскрипции объемом 50 мкл содержал: 3 мкг РНК и 0.25 нмоль “случайных” праймеров-наномеров (Биосинтез, Россия), 5 мкл буфера F2, 5 мкл 4 мМ dNTP, 25 мкл 40%-ного раствора трегалозы, 1 мкл BSA (10 мг/мл) и 5 мкл 40 ед. акт. обратной транскриптазы MoMLV (реактивы производства Вектор-Бест, Россия). Синтез кДНК проводили при 37°С – 1 ч, 42°С – 50 мин, 50°С – 10 мин. Фермент инактивировали при 75°С в течение 5 мин.

Для проверки отсутствия геномной ДНК в полученных растворах проводили ПЦР с раствором РНК и праймерами на ген *Adra2A* [3]. Для оценки качества реакции обратной транскрипции каждый образец полученной кДНК проверяли с постановкой ПЦР в реальном времени с праймерами на референсный ген *Ppia*.

ПЦР в реальном времени осуществлялась на амплификаторе LightCycler® 96 System (Roche) в следующем температурном режиме: предварительный прогрев при 94°С – 2 мин; затем 38–45 циклов: денатурация при 94°С – 15 с, отжиг – 20 с, элонгация при 72°С – 20 с, сбор данных по флуоресценции – 10 с (табл. 1). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала буфер F2 для ПЦР (Вектор-Бест, Россия), 0.2 мМ dNTPs, SYBR Green I (Медиген, Россия) в разведении 1 : 20000, по 150 нМ прямого

Таблица 1. Праймеры, используемые для ПЦР в реальном времени
Table 1. Gene-specific primers used for RT-PCR

Ген Gene	Праймеры Primer sequence	*T*, °C		Длина продукта, п.н. Amplificate fragment, bp.
		отжиг annealing	регистрация detection	
Grin1	F: 5'-GAT ACC AGA TGT CCA CCA G -3' R: 5'-GTA CAG ATC ACC TTC TTC ACT-3'	64	87	140
Grin2A	F: 5'- CCA TTG CTG TCT TCG TTT T -3' R: 5'-TGC TGG TTG TGC CTT TA-3'	62	87	178
Grin2B	F: 5'-AGTTTCATCCCTGAGCC -3' R: 5'-TTCCATTTCCCCACCCT-3'	64	87	208
Gria1	F: 5'-GGGAGGGAAGACCAAATCTA -3' R: 5'-ACAAAGCAAACCTAAAAGCCG-3'	62	87	201
Grm2	F: 5'- TCTATGCCTTCAAGACCC -3' R: 5'- CTGCACCCGATAATCACT -3'	61	88	141
Grm3	F:5'- CCA AGC TCT GTG ATG CAA -3' R: 5'- TCT TCC CAT CCC GTC TC -3'	64	85	152
Slc17a6	F: 5'- ACATCCATGCCCGTCTA-3' R: 5'- AAGTCTGCAATTTGCCCC-3'	64	88	196
Hprt1	F: 5'-CATTGTGGCCCTCTGTGTG-3' R: 5'-AACTTTTATGTCCCCCGTTGA-3'	61–64	86	166
Ppia	F: 5'-TTCCAGGATTCATGTGCCAG-3' R: 5'-CTTGCCATCCAGCCACTC-3'	61–64	88	206
Gapdh	F: 5'- GTGCCAGCCTCGTCTCATA-3' R: 5'-TCGTTGATGGCAACAATG TCC-3'	61–64	89	123

и обратного праймеров и 1 ед. акт. Hot-Start полимеразы (Вектор-Бест, Россия) и раствор исследуемой кДНК. После окончания ПЦР снимали кривые плавления для контроля специфичности реакции.

Полуколичественную оценку экспрессии мРНК исследуемых генов осуществляли относительно количества мРНК 3-х референсных генов: *Hprt1*, *Gapdh*, *Ppia* методом среднего геометрического [22]. Расчет относительной экспрессии генов производили с использованием метода стандарных кривых [23]. Из полученных образцов кДНК для каждой структуры мозга делали “усредненный” раствор кДНК, который использовали для построения калибровочных кривых. В эксперименте образцы кДНК с праймерами для целевого гена (три повтора на образец кДНК) были отнесены к стандартным разведениям “усредненного” раствора кДНК с теми же праймерами (в двух повторах). Аналогично поступали с генами сравнения. Затем эксперимент повторяли, меняя положение образцов на планшете. Таким образом, всего делали 6 повторов на образец. Далее значение целевого гена нормализовали относительно среднего геометрического уровня референсных генов.

Праймеры, используемые для определения экспрессии генов (табл. 1), были подобраны авторами с использованием онлайн-олигоанализатора с сайта www.eu.idtdna.com и проверены в базе данных Blast (Basic Local Alignment Search Tool) на специфичность. В качестве дополнительной проверки праймеров оценивали длину продукта ПЦР с помощью электрофореза ДНК в 1.5%-ном агарозном геле. Для исследуемых генов праймеры подбирались для всех сплайс-вариантов при их наличии.

Статистическая обработка

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0. Анализ данных по экспрессии генов проводили с помощью методов

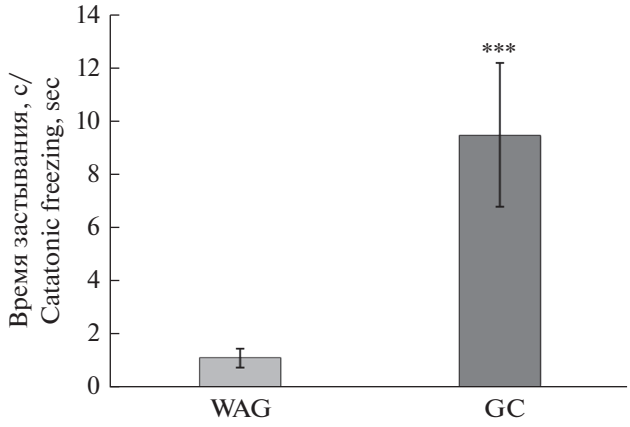

Рис. 1. Длительность кататонического застывания крыс линий ГК и WAG; *** – $p < 0.001$ по критерию Манн–Уитни.
Fig. 1. Duration of catatonic freezing of GC and WAG rats; *** – $p < 0.001$, Mann–Whitney U-test.

непараметрической статистики с использованием U-критерия Манн–Уитни для малых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средняя длительность кататонического застывания крыс линии ГК значительно выше, чем у крыс контрольной линии ($p < 0.001$ по критерию Манн–Уитни) (рис. 1).

Исследование генов глутаматной системы в лобной коре и гиппокампе у крыс линии ГК показало достоверно сниженную экспрессию мРНК гена *Grm3* в гиппокампе относительно контрольной линии WAG ($p < 0.05$) (рис. 2). Кроме того, в гиппокампе у крыс ГК была показана тенденция ($p = 0.08$) к увеличению экспрессии мРНК гена *Grin2A,* который кодирует NR2A субъединицу NMDA-рецептора.

В лобной коре статистически значимых отличий по экспрессии генов глутаматергической системы не обнаружено (рис. 3), однако была показана тенденция ($p = 0.07$ по критерию Манн–Уитни) к увеличению содержания мРНК гена *Grin 1* у крыс линии ГК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метаботропный глутаматный рецептор 3 (mGluR3) кодируется геном *Grm3*, и его активация ограничивает высвобождение глутамата в синаптическую щель [24]. Важно отметить, что ген *Grm3*, как и остальные гены рецепторов глутамата, исследованные в данной работе, входит в базу данных Rat Genome Database как ген-кандидат, ассоциированный с шизофренией. Показана связь полиморфных вариантов рецептора mGluR3, изменяющих его активность, и когнитивной функции при шизофрении у человека [25]; кроме того, агонист, действующий на mGluR3- и mGluR2-рецепторы, приводит к уменьшению как позитивных, так и негативных симптомов у больных шизофренией [26]. Функциональная роль mGluR3 исследована у мышей-нокаутов по *Grm3*, которые имели нарушение рабочей памяти и проявляли гиперактивность, что является эндофенотипом шизофрении [27].

Выявленное снижение экспрессии мРНК гена метаботропного рецептора *Grm3* в гиппокампе крыс ГК хорошо укладывается в пресинаптическую гипотезу патоге-

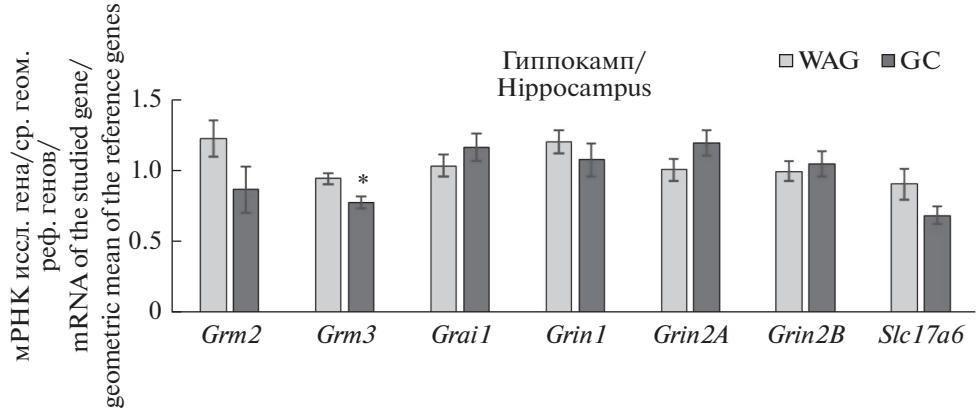

Рис. 2. Содержание мРНК генов глутаматной системы в гиппокампе крыс линий ГК и WAG; * – $p < 0.05$ по критерию Манн–Уитни.

Fig. 2. Glutamate system gene expression in the hippocampus of GC and WAG rats; * – significantly different from comparison group $p < 0.05$, Mann–Whitney U-test.

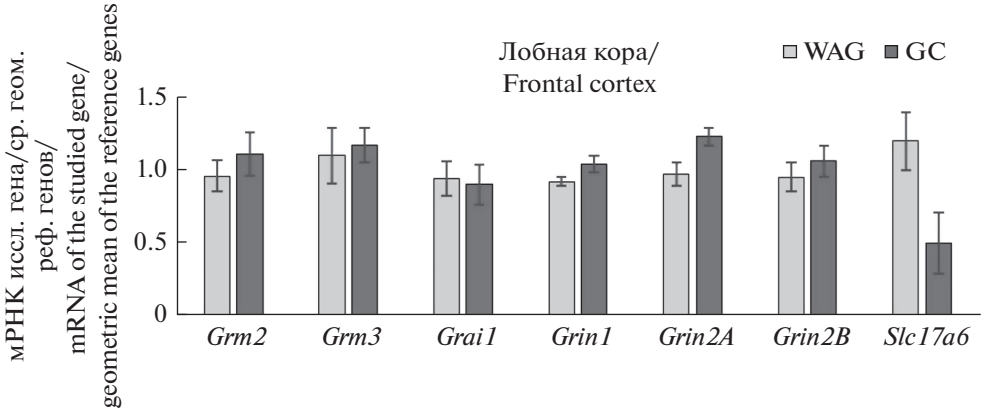

Рис. 3. Содержание мРНК генов глутаматной системы в лобной коре крыс линий ГК и WAG.

Fig. 3. Glutamate system gene expression in the frontal cortex of GC and WAG rats.

неза психопатологий, которая предполагает увеличение высвобождения глутамата в синаптическую щель вследствие нарушения функции ауторецепторов отрицательной обратной связи. Повышенный уровень глутамата приводит, как было показано, к апоптотической потере дендритов и синапсов и даже к апоптозу нейронов [28]. Такая гиперфункция глутаматной передачи может иметь разнообразные симптоматические проявления – многочисленные данные показывают, что высокий уровень глутамата в разных областях мозга связан с позитивными, негативными, а также когнитивными симптомами шизофрении (цит. по [29]). В лобной коре не было обнаружено достоверных различий по экспрессии *Grm3* и *Grm2*. Однако тот факт, что снижение экспрессии гена *Grm3* выявлено в гиппокампе – структуре, играющей существенную роль в когнитивной деятельности [30] и вовлеченной в патологический процесс при шизофрении [31], представляется особенно важным. Найденные различия по уровню мРНК *Grm3* в гиппокампе крыс ГК интересны и в

том плане, что гиппокамп участвует в регулировании эмоциональных реакций [32] и в формировании депрессивноподобного и тревожного поведения [33]. Ранее проделанные исследования выявили, что крысы линии ГК имеют реакции повышенной нервной возбудимости [34], повышенный уровень беспокойства и страха [35]. В данной работе также показано, что у крыс ГК длительность кататонического застывания значительно выше, чем у контроля (рис. 1), что согласуется с имеющимися данными [34]. Помимо вклада других нейромедаторных систем, описанные выше особенности поведения могут быть связаны с изменениями в трансмиссии глутамата, на что может указывать сниженное содержание мРНК гена метаботропного mGlu3 рецептора у крыс ГК.

Кроме того, у крыс линии ГК показана тенденция к увеличению уровня мРНК *Grin2A* в гиппокампе и тенденция к увеличению уровня мРНК *Grin1* в лобной коре по сравнению с крысами WAG. Указанные гены, как и *Grin2B*, который также был исследован в работе, кодируют субъединицы рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA-рецепторов). Известно, что глутаматный NMDA-рецептор представляет собой гетеротетрамерный рецептор, состоящий из субъединицы NR1 (кодируется геном *Grin1*), которая имеет домен связывания с глицином и одной из субъединиц NR2: NR2A, NR2B, NR2C, NR2D [24]. Субъединицы NR2, которые кодируются генами *Grin2A*, *Grin2B*, *Grin2C*, *Grin2D*, связываются с глутаматом, при этом различные сочетания этих субъединиц обеспечивают большую структурную и функциональную гетерогенность NMDA-рецепторов [36].

NR2A и NR2B, исследуемые в работе – это субъединицы, которые различаются по структуре и определяют биофизические, фармакологические и сигнальные свойства NMDA-рецепторов [37], при этом соотношение экспрессии мРНК генов NR2A/NR2B в лобной коре и в гиппокампе у крыс не отличались – 1.23 ± 0.16 (ГК) и 1.09 ± 0.17 (WAG), 1.13 ± 0.05 (ГК) и 1.02 ± 0.05 (WAG) соответственно. Изменение экспрессии NR2A- или NR2B-субъединиц в гиппокампе отмечается при различных психических расстройствах, таких как шизофрения и биполярное расстройство [9, 29], что, вероятно, указывает на вовлеченность этих субъединиц в развитие психопатологии. Кроме того, у линии мышей, имеющих гипоморфную мутацию гена субъединицы NR1, имеются нарушения социального и полового поведения, а также дефицит престимульного торможения [38], что говорит о вероятном вкладе NR1-субъединицы NMDA-рецепторов в данные процессы. Ранее было показано, что у крыс лини ГК нарушено престимульное торможение в ЦНС [3], однако результаты, полученные по экспрессии мРНК субъединицы NR1, не подтверждают ее вовлечение в процесс фильтрации сенсомоторной информации у крыс ГК. Показанные тенденции к изменению экспрессии генов NR1- и NR2A-субъединиц глутаматных рецепторов в исследованных структурах мозга крыс ГК, как и другие субъединицы NMDA-рецепторов, которые не были исследованы в рамках данной работы, требуют дальнейшего изучения, поскольку вопрос изменений глутаматной нейротрансмиссии у крыс линии ГК на уровне инотропных рецепторов остается открытым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в гиппокампе крыс линии ГК выявлено снижение экспрессии мРНК гена *Grm3* метаботропных глутаматных пресинаптических рецепторов, осуществляющих по механизму отрицательной обратной связи регуляцию выхода глутамата в синаптическую щель, что может влиять на нейротрансмиссию глутамата в этой структуре, и, в том числе, способствовать повышению возбудимости у крыс ГК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Сбор материала и все этапы пробоподготовки выполнены при поддержке гранта РФФИ № 17-04-01631 и бюджетного проекта № 0259-2021-0016. Анализ экспрессии генов поддержан грантом Министерства Образования и Науки РФ № 2019-0546 (FSUS-2020-0040) с использованием оборудования ЦКП геномных исследований ИЦиГ СО РАН.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kolpakov V.G., Barykina N.N., Alekhina T.A.* Some genetic animal models for comparative psychology and biological psychiatry. Novosib. Inst. 1996.
2. *Колпаков В.Г., Куликов А.В., Алехина Т.А., Чугуй В.Ф.* Кататония или депрессия? Линия крыс ГК – генетическая животная модель психопатологии. Генетика. 40(6): 1–7. 2004.[*Kolpakov V.G., Kulikov A.V., Alekhina T.A., CHuguj V.F.* Katatoniya ili depressiya? Liniya krys GK–geneticheskaya zhivotnaya model' psihopatologii. Genetika. 40(6): 1–7. 2004. (In Russ)].
3. *Рязанова М.А., Прокудина О.И., Алехина Т.А.* Экспрессия генов системы катехоламинов в среднем мозге и реакция престимульного торможения у крыс с генетической кататонией. Вавиловский журн. генетики и селекции. 21(7): 798–803. 2017. [*Ryazanova M.A., Prokudina O.I., Alekhina T.A.* Ekspressiya genov sistemy katekholaminov v srednem mozge i reakciya prestimul'nogo tormozheniya u krys s geneticheskoj katatoniej. Vavilovskij Zhurn. Genetiki i Selekcii. 21(7): 798–803. 2017. (In Russ)]. https://doi.org/10.18699/VJ17.296
4. *Wong E., Ungvari G.S., Leung S.-K., Tang W.-K.* Rating catatonia in patients with chronic schizophrenia: Rasch analysis of the Bush–Francis Catatonia Rating Scale. Int. J. Methods Psychiatr. Res. 16(3): 161–170. 2007. https://doi.org/10.1002/mpr.224
5. *Medda P., Toni C., Luchini F., Mariani M.G., Mauri M., Perugi G.* Catatonia in 26 patients with bipolar disorder: clinical features and response to electroconvulsive therapy. Bipolar Disord. 17(8): 892–901. 2015. https://doi.org/10.1111/bdi.12348
6. *Northoff G.* Catatonia and neuroleptic malignant syndrome: psychopathology and pathophysiology. J. Neural Transm. 109(12): 1453–1467. 2002. https://doi.org/10.1007/s00702-002-0762-z
7. *Moghaddam B., Javitt D.* From revolution to evolution: The glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. Neuropsychopharmacology. 37(1): 4–15. 2012. https://doi.org/10.1038/npp.2011.181
8. *Hirjak D., Kubera K.M., Wolf R.C., Northoff G.* Going Back to Kahlbaum's Psychomotor (and GABAergic) Origins: Is Catatonia More Than Just a Motor and Dopaminergic Syndrome? Schizophr. Bull. 46(2): 272–285. 2020. https://doi.org/10.1093/schbul/sbz074
9. *Sokolov B.P.* Expression of NMDAR1, GluR1, GluR7, and KA1 Glutamate Receptor mRNAs Is Decreased in Frontal Cortex of "Neuroleptic-Free" Schizophrenics: Evidence on Reversible Up-Regulation by Typical Neuroleptics. J. Neurochem. 71(6): 2454–2464. 2002. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71062454.x
10. *Law A.J., Deakin J.F.W.* Asymmetrical reductions of hippocampal NMDARI glutamate receptor mRNA in the psychoses. Neuroreport. 12(13): 2971–2974. 2001. https://doi.org/10.1097/00001756-200109170-00043
11. *McCullumsmith R.E., Kristiansen L.V., Beneyto M., Scarr E., Dean B., Meador-Woodruff J.H.* Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. Brain Res. 1127(1): 108–118. 2007. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.011
12. *Martucci L., Wong A.H.C., De Luca V., Likhodi O., Wong G.W.H., King N., Kennedy J.L.* N-methyl-d-aspartate receptor NR2B subunit gene GRIN2B in schizophrenia and bipolar disorder: Polymorphisms and mRNA levels. Schizophr. Res. 84(2–3): 214–221. 2006. https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2006.02.001
13. *Qin S., Zhao X., Pan Y., Liu J., Feng G., Fu J., Bao J., Zhang Zh., He L.* An association study of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) and NR2B subunit gene (GRIN2B) in schizophrenia with universal DNA microarray. Eur. J. Hum. Genet. 13(7): 807–814. 2005. https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201418
14. *Bota R., Groysman L., Momii A.* Catatonia as a Syndrome Characterized by GABAergic Interneuronal Dysfunction Mediated by NMDA Receptors. Br. J. Med. Med. Res. 19(11): 1–6. 2017. https://doi.org/10.9734/bjmmr/2017/30718

15. *Rogers J.P., Pollak T. A., Blackman G., David A.S.* Catatonia and the immune system: a review. The Lancet Psychiatry. 6(7): 620–630. 2019. https://doi.org/10.1016/S2215-0366(19)30190-7
16. *Harrison P.J., Burnet P.* The group II metabotropic glutamate receptor 3 (mGluR3, mGlu3, GRM3): expression, function and involvement in schizophrenia. J. Psychopharmacol. 22(3):308–322. 2008. https://doi.org/10.1177/0269881108089818
17. *Takamori S., Rhee J.S., Rosenmund C., Jahn R.* Identification of Differentiation-Associated Brain-Specific Phosphate Transporter as a Second Vesicular Glutamate Transporter (VGLUT2). J. Neurosci. 21(22): RC182. 2001. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-22-j0002.2001
18. *Wallen-Mackenzie A., Nordenankar K., Fejgin K., Lagerström M.C., Emilsson L., Fredriksson R., Wass C., Andersson D., Egecioglu E., Andersson M., Strandberg J., Lindhe Ö., Schiöth H.B., Chergui K., Hanse E., Långström B., Fredriksson A., Svensson L., Roman E., Kullander K.* Restricted Cortical and Amygdaloid Removal of Vesicular Glutamate Transporter 2 in Preadolescent Mice Impacts Dopaminergic Activity and Neuronal Circuitry of Higher Brain Function. J. Neurosci. 29(7): 2238–2251. 2009. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5851-08.2009
19. *Nordenankar K., Smith-Anttila C.J.A., Schweizer N., Viereckel T., Birgner C., Mejia-Toiber J., Morales M., Leao R.N., Wallén-Mackenzie Å.* Increased hippocampal excitability and impaired spatial memory function in mice lacking VGLUT2 selectively in neurons defined by tyrosine hydroxylase promoter activity. Brain Struct. Funct. 220. 2171–2190. 2015. https://doi.org/10.1007/s00429-014-0778-9
20. *Martinez-Gras I., Rubio G., del Manzano B.A., Rodriguez-Jimenez R., Garcia-Sanchez F., Bagney A., Carlos Leza J., Borrell J.* The relationship between prepulse inhibition and general psychopathology in patients with schizophrenia treated with long-acting risperidone. Schizophr. Res. 115(2–3): 215–221. 2009. https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.09.035
21. *García-Sánchez F., Martínez-Gras I., Rodríguez-Jiménez R., Rubio G.* [Prepulse inhibition of the startle response/reflex in neuropsychiatric disorders]. Rev. Neurol. 53(7): 422–32. 2011.
22. *Vandesomlele J.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data.pdf. Genome Biol. 3(7): 1–12. 2002. https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034
23. *Larionov A., Krause A., Miller W.R.* A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinformatics. 6(1): 1–16. 2005. https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-62
24. *Kew J.N.C., Kemp J.A.* Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. Psychopharmacology. 179(1): 4–29. 2005. https://doi.org/10.1007/s00213-005-2200-z
25. *Mössner R., Schuhmacher A., Schulze-Rauschenbach S., Kühn K.-U., Rujescu D., Rietschel M., Zobel A., Franke P., Wölwer W., Gaebel W., Häfner H., Wagner M., Maier W.* Further evidence for a functional role of the glutamate receptor gene GRM3 in schizophrenia. Eur. Neuropsychopharmacol. 18(10): 768–772. 2008. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.05.007
26. *Patil S.T., Zhang L., Martenyi F., Lowe S.L., Jackson K.A., Andreev B.V., Avedisova A.S., Bardenstein L.M., Gurovich I.Y., Morozova M.A., Mosolov S.N., Neznanov N.G., Reznik A.M., Smulevich A.B., Tochilov V.A., Johnson B.G., Monn J.A., Schoepp D.D.* Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. Nat. Med. 13(9): 1102–1107. 2007. https://doi.org/10.1038/nm1632
27. *Fujioka R., Nii T., Iwaki A., Shibata A., Ito I., Kitaichi K., Nomura M., Hattori S., Takao K., Miyakawa T., Fukumaki Y.* Comprehensive behavioral study of mGluR3 knockout mice: implication in schizophrenia related endophenotypes. Mol. Brain. 7(1): 31. 2014. https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-31
28. *Stone J.M., Morrison P.D., Pilowsky L.S.* Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia – A synthesis and selective review. J. Psychopharmacol. 21(4): 440–452. 2007. https://doi.org/10.1177/0269881106073126
29. *Merritt K., McGuire P., Egerton A.* Relationship between Glutamate Dysfunction and Symptoms and Cognitive Function in Psychosis. Front. Psychiatry. 4: 151. 2013. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2013.00151
30. *Sweatt J. D.* Hippocampal function in cognition. Psychopharmacology (Berl). 174(1): 99–110. 2004. https://doi.org/10.1007/s00213-004-1795-9
31. *Harrison P.J.* The hippocampus in schizophrenia: A review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. Psychopharmacology. 174(1): 151–162. 2004. https://doi.org/10.1007/s00213-003-1761-y

32. *Schumacher A., Villaruel F.R., Riaz S., Lee A.C.H., Ito R.* Ventral hippocampal CA1 and CA3 differentially mediate learned approach-avoidance conflict processing. Curr. Biol. 28(8): 1318. 2018. https://doi.org/10.1101/180513
33. *McEwen B.S., Nasca C., Gray J.D.* Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. Neuropsychopharmacology. 41(1): 3–23. 2016. https://doi.org/10.1038/npp.2015.171
34. *Рязанова М.А., Игонина Т.Н., Алехина Т.А., Прокудина О.И., Рязанова М.А.* Увеличение доли "нервных" животных в ходе селекции на каталонию: участие в каталонических реакциях центральных адренорецепторов. Генетика. 48(11): 1–8. 2012. [*Ryazanova M.A., Igonina T.N., Alekhina T.A., Prokudina O.I., Ryazanova M.A.* Uvelichenie doli "nervnyh" zhivotnyh v hode selekcii na katatoniyu: uchastie v katatonicheskih reakciyah central'nyh adrenoreceptorov. Genetika. 48(11): 1–8. 2012. (In Russ)].
35. *Петрова Е.В.* Особенности изменения врожденных и приобретенных форм поведения крыс с генетической каталепсией. Журн. высшей нервн. деятельности. 40 (3): 475–480. 1990. [*Petrova E.V.* Osobennosti izmeneniya vrozhdennyh i priobretennyh form povedeniya krys s geneticheskoj katalepsiej. Zhurn. Vysshej Nervn. Deyatel'nosti. 40 (3): 475–480. 1990. (In Russ)].
36. *Lynch D.R., Guttmann R.P.* NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. Curr. Drug. Targets. 2(3): 215–231. 2001.
37. *Wyllie D.J.A., Livesey M.R., Hardingham G.E.* Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. Neuropharmacology. 74: 4–17. 2013. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2013.01.016
38. *Duncan G.E., Moy S.S., Perez A., Eddy D.M., Zinzow W.M., Lieberman J.A., Snouwaert J.N., Koller B.H.* Deficits in sensorimotor gating and tests of social behavior in a genetic model of reduced NMDA receptor function. Behav. Brain Res. 153(2): 507–519. 2004. https://doi.org/10.1016/J.BBR.2004.01.008

Expression of Glutamate Receptor Genes in the Hippocampus and Frontal Cortex in GC Strain Rats with Genetic Catatonia

V. S. Plekanchuk[a, b, *], and M. A. Ryazanova[a]

[a] *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*
[b] *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*
**e-mail: lada9604@mail.ru*

The GC rat strain (the abbreviation of the words "genetic" and "catatonia") was obtained in the Institute of Cytology and Genetics of the SB RAS by breeding to enhance the passive-defensive freezing reaction in response to a weak stress stimulus. GC rats have a predisposition to catatonic reactions, as well as a number of behavioral and biochemical features corresponding to the homologous characteristics of patients with schizophrenia and depression. At the basis of the catatonic syndrome, as in schizophrenia, is believed to be the presence of a complex disturbance in functioning brain's neurotransmitter systems, with special attention having been recently paid to glutamatergic system dysfunction, proposing the glutamate hypothesis of psychopathologies. Glutamate is the main excitatory mediator in the central nervous system and realize physiological effects through ionotropic (AMPA-, NMDA-, kainate) and metabotropic (mGlu) glutamate receptors. There are many studies indicating a change in the expression of glutamate receptor genes and the composition of their subunits in schizophrenia and bipolar disorders, as well as indicating the involvement of NMDA glutamate receptors in the manifestation of catatonic syndrome. In this regard, the aim of the work was to study the expression of the genes of glutamate system in the hippocampus and the frontal cortex of GC rats. Real-time PCR showed low expression of *Grm3* gene encoding the metabotropic glutamate autoreceptor in the hippocampus of rats with genetic catatonia. The expression of *Grin1*, *Grin2A*, *Grin2B*, *Gria1*, *Grm2*, *Slc17a6* in the frontal cortex and the hippocampus, as well as the *Grm3* gene in the frontal cortex, did not differ from the control. Thus, the revealed low expression of mRNA of the Grm3 gene in the hippocampus can affect the neurotransmission of glutamate in this structure, and, among other things, contribute to an increase in nervous excitability in GC rats.

Keywords: glutamatergic receptors, *Grm3*, vesicular glutamate transporter, hippocampus, frontal cortex, catatonia, GC rats, Real-time PCR

ЦИТИРОВАТЬ:

Плеканчук В.С., Рязанова М.А. Экспрессия генов глутаматных рецепторов в гиппокампе и лобной коре у крыс линии ГК с генетической кататонией. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(2): 232–242. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020060

TO CITE THIS ARTICLE:

Plekanchuk V.S., Ryazanova M.A. Expression of glutamate receptor genes in the hippocampus and frontal cortex in GC strain rats with genetic catatonia. Russian Journal of Physiology. 107(2): 232–242. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020060

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 2, с. 243–257

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА И АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АМИНОКИСЛОТНОГО ОБМЕНА В ГЕМОХОРИАЛЬНОЙ ПЛАЦЕНТЕ РАЗНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. Т. Н. Погорелова[1, *], В. О. Гунько[1], А. А. Никашина[1], И. А. Аллилуев[2]

[1]Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия
[2]Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия
**E-mail: tnp.rniiap@yandex.ru*

Поступила в редакцию 29.09.2020 г.
После доработки 26.11.2020 г.
Принята к публикации 17.12.2020 г.

Изучен аминокислотный состав и активность ферментов аминокислотного обмена тканей плаценты. Объектом исследования являлись морские свинки (*Cavia porcellus*) и макаки-резус (*Macaca mulatta*), имеющие, подобно человеку, гемохориальный тип плаценты. В исследование были также включены женщины с неосложненным течением беременности и срочными родами (39–40 нед.). Установлено, что во всех исследованных тканях наибольшее количество свободных и связанных аминокислот содержится в плодовой части плаценты. В плодовой части плаценты обнаружена и максимальная активность ферментов аминокислотного обмена: аминотрансфераз, дезаминаз, аминосинтетаз. Общим для плаценты морских свинок, обезьян и человека является также высокий уровень дикарбоновых аминокислот и глутамина. Наряду с общими чертами, в аминокислотном обмене плаценты разных видов животных и человека выявлены некоторые различия, обусловленные эволюционными особенностями развития органа, спецификой сложившихся материнско-плодовых взаимоотношений. Межвидовые отличия однотипных частей плаценты касаются отдельных аминокислот, содержание большинства из которых в плаценте грызунов превышает аналогичные показатели у приматов. Между плацентами человека и обезьяны различия изученных биохимических показателей менее выражены. Еще одним отличием плаценты морской свинки от плаценты человека и обезьяны является неодинаковое нековалентное связывание аминокислот с биополимерами, модифицирующее состояние акцепторных групп белков. Аналогичные ткани последа разных видов животных и человека отличаются и активностью ферментов аминокислотного обмена. Между содержанием свободных аминокислот и показателями активности ферментов имеется тесная корреляционная зависимость, свидетельствующая об их важной роли в формировании плацентарного аминокислотного фонда.

Ключевые слова: гемохориальная плацента, приматы, грызуны, аминокислотный обмен

DOI: 10.31857/S0869813921020072

Определяющей чертой эволюционного процесса явилось усиление независимости развивающегося организма от внешних условий, поэтому появление плацентарных млекопитающих стало вершиной филогенетического развития. Относи-

тельное постоянство и необходимый состав внутренней среды организма высших животных и человека в процессе пренатального онтогенеза обеспечивается в основном плацентой, осуществляющей взаимосвязь между организмом матери и плодом и создающей оптимальные условия для его роста и развития. Плацента – самый молодой в эволюционном ряду орган, отличающийся прежде всего тем, что за относительно небольшой период времени претерпевает быстрое развитие и достигает полной зрелости. Это предъявляет повышенные требования к метаболическим процессам, лежащим в основе функционирования плаценты. В процессе эволюции становление плацентарного барьера шло по пути наиболее тесного контакта между кровью матери и плода. Оптимальные условия в этом отношении характерны для гемохориального типа плаценты (приматы, грызуны), в которой кровотоки плода и матери наиболее сближены и разделены лишь эндотелием плодовых капилляров, стромой и эпителиальным покровом хориальных ворсин. Гемохориальная плацента представляет собой одну из наиболее сложных тканей организма. Уникальная структура плаценты определяет ее чрезвычайную полифункциональность: она выполняет трофическую, дыхательную, защитную, транспортную, гормонпродуцирующую и другие функции [1–3].

В числе многочисленных функций плаценты важная роль принадлежит снабжению эмбриона и плода питательными веществами. Среди этих веществ одно из ведущих мест занимают свободные аминокислоты, прежде всего, как структурные составляющие белковых молекул, поскольку плацента, являясь быстро развивающимся органом, характеризуется чрезвычайно высокой скоростью синтеза белков [4, 5]. Помимо участия в биосинтезе плацентарных белков, аминокислоты включаются в энергетический обмен, служат предшественниками многих биоактивных компонентов, таких как вазоактивные соединения, полиамины, структурные компоненты нуклеиновых кислот [6, 7]. Некоторые из них выполняют самостоятельные функции, в частности, как индукторы синтеза гормонов, регуляторы иммунного ответа, активаторы клеточной дифференциации и пролиферативных процессов, интенсивно протекающих в фетоплацентарном комплексе [8, 9]. Кроме того, исследования последних лет позволили установить, что трансплацентарный переход аминокислот от матери к плаценте и от плаценты к плоду влияет на “внутриутробное программирование” постнатальной патологии [10]. Многочисленные химические реакции, в которых участвуют аминокислоты, перерабатывая и реализуя внешнюю информацию, осуществляются с помощью различных ферментов, нередко соединяющих аминокислотный метаболизм с другими видами обмена.

В настоящее время известно, что фонд аминокислот различных тканей складывается из двух фракций – свободных и нековалентно связанных с белками. Впервые сообщение о связанных аминокислотах было опубликовано в статье Elliott [11]. Связи этих аминокислот – ионные, водородные, гидрофобные и другие – менее прочные, чем пептидные. Они разрушаются при сдвиге pH, изменении ионного состава среды, обработке гипотоническими растворами [12]. Связанные аминокислоты, являясь регуляторами вторичной и третичной структур белков, могут стабилизировать или, напротив, модифицировать белковую молекулу. Для нормального функционирования органов, очевидно, важен не только абсолютный уровень аминокислот, но и соотношение свободных и связанных форм. Однако сведения о них немногочисленны, особенно это касается плаценты [13].

Исходя из вышеизложенного, настоящая работа посвящена изучению содержания свободных и связанных аминокислот, а также активности некоторых ферментов аминокислотного обмена в тканях гемохориальной плаценты разных видов животных и человека с целью выяснения возможных различий и сходства между ними.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили 36 морских свинок (*Cavia porcellus*) с датированным сроком беременности (точность установления начала беременности 6 ч, роды в 59–60 дней), находящихся в обычных условиях вивария на стандартном пищевом рационе и 9 макак-резус (*Macaca mulatta*) с датированным сроком беременности (точность установления начала беременности 2–3 дня, роды в 161–164 дня), находящихся в вольерах МБУ "Ростовский-на-Дону зоопарк". В исследование были также включены 32 клинически здоровые женщины с неосложненным течением беременности и своевременными родами (39–40 нед.). Обследованные женщины наблюдались и были родоразрешены в Ростовском НИИ акушерства и педиатрии в рамках программы "Акушерский мониторинг".

Материалом исследования служили плодовая и материнская части плацент. Плодовая часть плаценты у человека и обезьяны представлена ворсистым хорионом, материнская – децидуальной оболочкой. У морской свинки плодовая часть – лабиринтные и внелабиринтные отделы трофобласта, а материнская – тонкий слой децидуальных клеток, прилегающих к эндометрию матки. Плаценты брали сразу после родов при соблюдении холодового режима (4°C). Вырезанные образцы (10 г) промывали охлажденным физиологическим раствором и гомогенизировали (при 2–4°C) с помощью гомогенизатора Ultra-Turrax (IKA, Германия) в PBS-буфере.

В безбелковых экстрактах тканей определяли содержание свободных аминокислот на автоматическом анализаторе AAA-400 (Microtechno, Чехия). Подготовку тканей и анализ проводили согласно инструкции к анализатору по стандартной программе с использованием трех натрий-цитратных буферных растворов pH 3.25, 4.25 и 5.28. Идентификацию аминокислот, расчет площади пиков и определение концентрации осуществляли по результатам анализа соответствующих стандартов (Sigma-Aldrich, США) для калибровки анализатора.

Аминокислоты, нековалентно связанные с белками (или белково-липидными комплексами), определяли после многоступенчатой обработки гомогенатов солевыми растворами [12]. Для этого навески тканей плаценты гомогенизировали в 4-х объемах солевой смеси, содержащей 0.15 М растворы NaCl, KCl, H_2SO_4 и 0.11 М раствор фосфатного буфера (pH 7.6). Гомогенат после повторного замораживания и оттаивания центрифугировали при 0°C в течение 15 мин при 20000 *g* (центрифуга Avanti J-30I Beckman Coulter, США). Осадок I промывали дважды указанной солевой смесью и центрифугировали при тех же условиях. Двукратное промывание осадка достаточно, поскольку последующие элюаты не содержали свободных аминокислот. Полученный осадок II суспендировали в дистиллированной воде и добавляли 10%-ный раствор сульфосалициловой кислоты, при этом осаждались белки и одновременно освобождались связанные аминокислоты. После отделения белков 10-минутным центрифугированием при 6000 *g* в надосадочной жидкости определяли связанные аминокислоты, количественную оценку содержания которых также проводили на анализаторе.

Активность аспартат- (АСТ, КФ 2.6.1.1), аланин- (АЛТ, КФ 2.6.1.2), цистеин- (Цис-Т, КФ 2.6.1.3), тирозин- (Тир-Т, КФ 2.6.1.5) аминотрансфераз определяли по приросту глутаминовой кислоты после инкубации соответствующей аминокислоты с α-кетоглутаровой кислотой. Об активности фосфат-активируемой глутаминазы (ФАГ; КФ 3.5.1.2) и активности глутаминсинтетазы (ГС; КФ 6.3.1.2) судили по снижению количества глутамина или соответственно по его приросту. Содержание глутаминовой кислоты и ее амида глутамина измеряли на аминокислотном анализаторе. Активность глутамин-кетокислотной аминотрансферазы (ГКТ, КФ 2.6.1.15) определяли по накоплению количества аммиака, оцененного спектрофотометрически с помощью реакции несслеризации после инкубации глутамина с щавелевоуксусной

кислотой. Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.13) оценивали по приросту восстановленного никотинамидадениндинуклеотида при длине волны 340 нм. При проведении ферментативных реакций использовали известные инкубационные смеси [14].

Статистическую обработку данных проводили с помощью лицензионного пакета программ Statistica 6.0. (StatSoft Inc.). Оценка характера распределения данных с помощью критерия Шапиро–Уилка свидетельствует об их нормальном распределении. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Статистическая обработка выполнена с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) и теста Тьюки (Tukey) для множественного сравнения средних величин. Корреляционный анализ выполнен с использованием критерия Пирсона и расчетом коэффициента корреляции r. Результаты оценивали как статистически значимые при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у всех взятых объектов содержание свободных аминокислот в плодовой части плаценты выше, чем в материнской (табл. 1).

Суммарное содержание свободных аминокислот в плодовой части плаценты морской свинки превышает аналогичные величины в материнской части в 1.54 раза. Для плаценты обезьян это отличие составляло 1.45, а для плаценты человека – 1.52 раза. Межтканевые различия имеют место и для связанных аминокислот, содержание которых в плодовой части плаценты морской свинки, обезьяны и человека выше, чем в материнской соответственно в 1.55, 1.62 и 1.57 раз (табл. 2). Во всех изученных объектах уровень связанных аминокислот ниже, чем свободных. Коэффициенты отношения свободных аминокислот к их связанным фракциям в разных частях плаценты животных и человека колеблются в среднем от 4.7 до 5.4. Данные отличия в аминокислотном обмене тканей плаценты, очевидно, зависят от своеобразия их морфофункциональных характеристик в связи с неодинаковой ролью в процессе внутриутробного развития плода. О высокой метаболической активности фетальной части плаценты по сравнению с материнской свидетельствует также значительная концентрация в ней нуклеиновых кислот, белков, наибольшая скорость синтеза белков [15]. Эти метаболические “преимущества” ворсистого хориона, по-видимому, связаны с его центральной ролью в обмене веществ между материнским организмом и плодом.

Помимо межтканевых вариаций, для содержания аминокислот однотипных частей плаценты характерны существенные межвидовые отличия. Плацента морской свинки отличается более высоким уровнем многих аминокислот по сравнению с таковым в тканях человека и обезьяны. Это различие может быть связано с особенностями анте- и пренатального развития плодов морской свинки, рождающихся более зрелыми. Между суммарным уровнем свободных аминокислот в плаценте человека и обезьяны различия менее выражены.

Сопоставление содержания отдельных аминокислот выявило более значимые как межтканевые, так и межвидовые отличия. В плодовой и материнской частях плаценты обезьяны содержание свободных фракций лизина, аргинина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, тирозина, метионина, валина ниже, чем соответствующие величины в тканях морской свинки (в среднем на 20.6–45.2%, рис. 1).

Особый интерес представляет более высокий уровень аргинина в плаценте морской свинки. Эта аминокислота играет важную роль в развитии беременности как предшественник биосинтеза оксида азота и полиаминов. Повышенное содержание аргинина приводит к увеличению продукции полиаминов, необходимых для под-

Таблица 1. Содержание свободных аминокислот в плаценте разных видов животных и человека
Table 1. Content of free amino acids in placenta of different animal and human species

Амино кислоты, мкмоль/г ткани Amino acids, μmol/g of tissue	Морская свинка Guinea pig $n = 36$		Обезьяна Monkey $n = 9$		Человек Human $n = 32$	
	плодовая часть плаценты fetal part of placenta	материнская часть плаценты maternal part of placenta	плодовая часть плаценты fetal part of placenta	материнская часть плаценты maternal part of placenta	плодовая часть плаценты fetal part of placenta	материнская часть плаценты maternal part of placenta
Лиз/Lys	0.46 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.31 ± 0.02 $p_1 < 0.001$	0.26 ± 0.02 $p_1 < 0.01$	0.34 ± 0.03 $p_2 < 0.01$	0.29 ± 0.02 $p_2 < 0.05$
Арг/Arg	0.44 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.29 ± 0.02 $p_1 < 0.001$	0.20 ± 0.01 $p_1 < 0.001$	0.31 ± 0.03 $p_2 < 0.001$	0.24 ± 0.02 $p_2 < 0.01$
Асп/Asp	1.29 ± 0.08	0.74 ± 0.05	0.77 ± 0.05 $p_1 < 0.001$	0.51 ± 0.04 $p_1 > 0.05$	0.98 ± 0.06 $p_2 < 0.001$	0.59 ± 0.04 $p_2 > 0.05$
Тре/Thr	0.27 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.36 ± 0.03 $p_1 = 0.01$	0.25 ± 0.02 $p_1 > 0.05$	0.42 ± 0.03 $p_2 < 0.001$	0.30 ± 0.03 $p_2 < 0.001$
Сер/Ser	0.38 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.54 ± 0.03 $p_1 < 0.001$	0.32 ± 0.03 $p_1 < 0.01$	0.58 ± 0.04 $p_2 < 0.001$	0.36 ± 0.03 $p_2 < 0.001$
Глу/Glu	2.55 ± 0.19	1.61 ± 0.11	1.53 ± 0.10 $p_1 < 0.001$	1.02 ± 0.07 $p_1 < 0.001$	1.92 ± 0.16 $p_2 < 0.001$	$1,27 \pm 0.07$ $p_2 < 0.05$
Глн/Gln	0.40 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.56 ± 0.03 $p_1 < 0.001$	0.34 ± 0.03 $p_1 < 0.05$	0.70 ± 0.05 $p_2 < 0.001$	0.43 ± 0.03 $p_2 < 0.001$
Ала/Ala	0.50 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.65 ± 0.04 $p_1 < 0.01$	0.43 ± 0.03 $p_1 > 0.05$	0.87 ± 0.06 $p_2 < 0.001$	0.54 ± 0.05 $p_2 < 0.001$
Вал/Val	0.62 ± 0.05	0.44 ± 0.03	0.34 ± 0.02 $p_1 < 0.001$	0.32 ± 0.03 $p_1 < 0.01$	0.43 ± 0.04 $p_2 < 0.001$	0.28 ± 0.03 $p_2 < 0.001$
Мет/Met	0.27 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01 $p_1 < 0.001$	0.10 ± 0.01 $p_1 < 0.01$	0.17 ± 0.01 $p_2 < 0.001$	0.12 ± 0.01 $p_2 < 0.05$
Лей/Leu	0.56 ± 0.05	0.32 ± 0.02	0.38 ± 0.03 $p_1 < 0.001$	0.23 ± 0.02 $p_1 < 0.05$	0.46 ± 0.04 $p_2 < 0.01$	0.27 ± 0.02 $p_2 > 0.05$
Тир/Tyr	0.41 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.29 ± 0.02 $p_1 < 0.001$	0.27 ± 0.02 $p_1 < 0.05$	0.31 ± 0.02 $p_2 < 0.01$	0.24 ± 0.02 $p_2 < 0.01$

Здесь и в табл. 2 и 3: статистическая значимость между показателями морской свинки и обезьяны – p_1, морской свинки и человека – p_2. Данные представлены как $M \pm SEM$.
Here and in table 2 and table 3: statistical significance between indicators of guinea pig and monkey – p_1, guinea pig and human – p_2. Data presented as $M \pm SEM$.

Таблица 2. Содержание связанных аминокислот в плаценте разных видов животных и человека
Table 2. The content of bound amino acids in the placenta of different animal and human species

Амино кислоты, мкмоль/г ткани Amino acids, μmol/g of tissue	Морская свинка Guinea pig $n = 36$		Обезьяна Monkey $n = 9$		Человек Human $n = 32$	
	плодовая часть плаценты fetal part of placenta	материнская часть плаценты maternal part of placenta	плодовая часть плаценты fetal part of placenta	материнская часть плаценты maternal part of placenta	плодовая часть плаценты fetal part of placenta	материнская часть плаценты maternal part of placenta
Лиз/Lys	0.093 ± 0.007	0.059 ± 0.003	0.151 ± 0.009 $p_1 < 0.001$	0.087 ± 0.005 $p_1 < 0.05$	0.158 ± 0.011 $p_2 < 0.001$	0.091 ± 0.006 $p_2 < 0.05$
Гис/His	0.061 ± 0.004	0.043 ± 0.003	0.088 ± 0.005 $p_1 < 0.001$	0.062 ± 0.004 $p_1 < 0.05$	0.102 ± 0.006 $p_2 < 0.001$	0.058 ± 0.004 $p_2 > 0.05$
Асп/Asp	0.371 ± 0.027	0.191 ± 0.011	0.199 ± 0.012 $p_1 < 0.001$	0.117 ± 0.007 $p_1 < 0.01$	0.240 ± 0.015 $p_2 < 0.001$	0.139 ± 0.009 $p_2 < 0.05$
Тре/Thr	0.021 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.029 ± 0.002 $p_1 < 0.05$	0.022 ± 0.001 $p_1 < 0.05$	0.033 ± 0.002 $p_2 < 0.001$	0.025 ± 0.002 $p_2 < 0.05$
Сер/Ser	0.058 ± 0.004	0.042 ± 0.003	0.083 ± 0.005 $p_1 < 0.01$	0.056 ± 0.004 $p_1 < 0.05$	0.096 ± 0.006 $p_2 < 0.001$	0.066 ± 0.004 $p_2 < 0.01$
Глу/Glu	0.741 ± 0.049	0.505 ± 0.046	0.381 ± 0.028 $p_1 < 0.001$	0.216 ± 0.019 $p_1 < 0.001$	0.455 ± 0.035 $p_2 < 0.001$	0.298 ± 0.083 $p_2 < 0.001$
Глн/Gln	0.072 ± 0.005	0.051 ± 0.003	0.094 ± 0.005 $p_1 < 0.05$	0.068 ± 0.002 $p_1 > 0.05$	0.106 ± 0.007 $p_2 < 0.001$	0.076 ± 0.006 $p_2 < 0.01$
Ала/Ala	0.077 ± 0.005	0.040 ± 0.003	0.099 ± 0.005 $p_1 < 0.05$	0.052 ± 0.004 $p_1 > 0.05$	0.107 ± 0.007 $p_2 < 0.001$	0.057 ± 0.005 $p_2 < 0.05$
Вал/Val	0.067 ± 0.005	0.044 ± 0.003	0.049 ± 0.004 $p_1 < 0.001$	0.032 ± 0.002 $p_1 < 0.05$	0.052 ± 0.004 $p_2 < 0.01$	0.035 ± 0.002 $p_2 > 0.05$
Мет/Met	0.032 ± 0.002	0.024 ± 0.002	0.023 ± 0.001 $p_1 < 0.01$	0.017 ± 0.001 $p_1 < 0.05$	0.025 ± 0.001 $p_2 < 0.05$	0.015 ± 0.001 $p_2 < 0.001$
Лей/Leu	0.075 ± 0.006	0.051 ± 0.004	0.056 ± 0.004 $p_1 < 0.05$	0.035 ± 0.002 $p_1 < 0.05$	0.060 ± 0.004 $p_2 < 0.05$	0.043 ± 0.003 $p_2 > 0.05$
Тир/Tyr	0.044 ± 0.003	0.037 ± 0.002	0.031 ± 0.001 $p_1 < 0.01$	0.026 ± 0.001 $p_1 < 0.01$	0.034 ± 0.002 $p_2 < 0.05$	0.029 ± 0.002 $p_2 < 0.05$

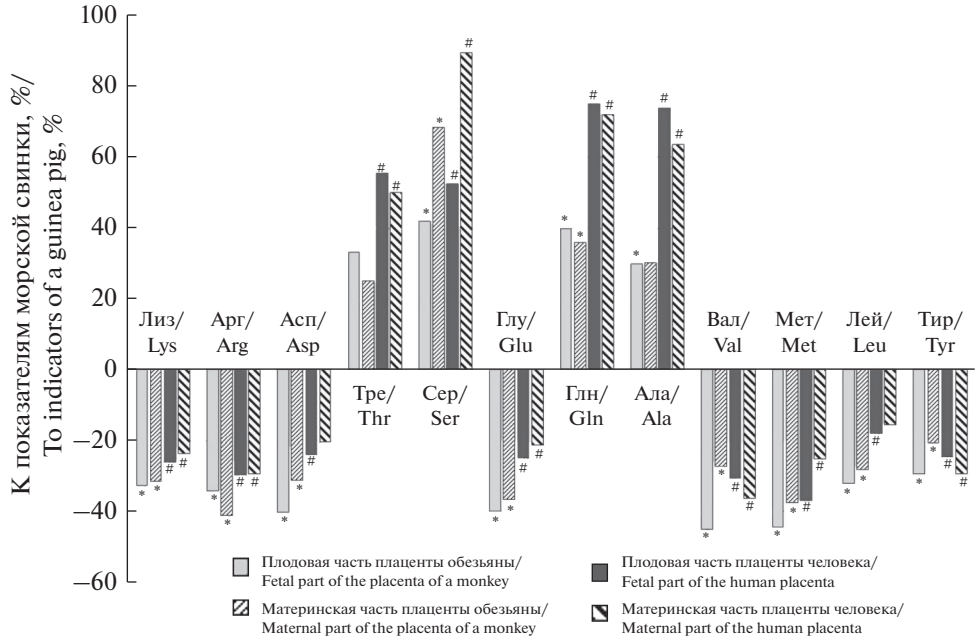

Рис. 1. Отличия содержания свободных аминокислот в тканях плаценты приматов относительно показателей у морской свинки.

Здесь и на рис. 2 и 3: для плодовой и материнской частей плаценты обезьян $n = 9$; для плодовой и материнской частей плаценты человека $n = 32$.

Обозначения: здесь и на рис. 2 и 3: * – различия между показателями морской свинки и обезьяны статистически значимы при $p < 0.05$, # – различия между показателями морской свинки и человека статистически значимы при $p < 0.05$. Принятые на рис. 1 и 2 сокращения: Лиз – лизин, Арг – аргинин, Гис – гистидин, Асп – аспарагиновая кислота, Тре – треонин, Сер – серин, Глу – глутаминвоая кислота, Глн – глутамин, Ала – аланин, Вал – валин, Мет – метионин, Лей – лейцин, Тир – тирозин.

Fig. 1. Differences in the content of free amino acids in Primate placental tissues relative to those in guinea pigs.

Here and in Figs. 2 and 3: for the fetal and maternal parts of the placenta of monkeys $n = 9$; for fruit and mother-part of the human placenta $n = 32$.

Note: * – the differences between the indicators of the guinea pig and the monkey are statistically significant at $p < 0.05$, # – the differences between the indicators of the guinea pig and the human are statistically significant at $p < 0.05$. Abbreviations in Fig. 1 and 2: Lys – lysine, Arg – arginine, His – histidine, Asp – aspartic acid, Tre – threonine, Ser – serine, Glu – glutamic acid, Gln – glutamine, Ala – alanine, Val – valine, Met – methionine, Leu – leucine, Tyr – tyrosine.

держания синтеза макромолекул и пролиферации клеток, значительная активность которой характерна для плаценты [16]. В экспериментальных исследованиях на мышах с гемохориальной плацентой показано позитивное влияние полиаминов на процесс развития беременности [17]. Известная способность полиаминов усиливать процессы фосфорилирования (особенно циклонуклеотидзависимого) в плаценте обеспечивает посттрансляционную модификацию белков, направленную на повышение их функциональной активности [18]. Кроме того, увеличение содержания полиаминов может приводить к относительной дезактивации транскрипционного фактора NF-kB, уменьшению экспрессии белка p53 [19] и, как следствие, снижению интенсивности апоптоза. Не менее важное значение имеет усиление плацентарной продукции оксида азота, сопровождающееся улучшением процессов

гемодинамики и поддержанием полноценного кровотока во всей биологической системе мать–плацента–плод.

Более высокий показатель содержания лизина в плаценте морской свинки, очевидно, создает оптимальные условия для метаболических процессов, протекающих с его участием, в частности, синтеза карнитина, оксилизина, митохондриального окисления жирных кислот. Определенное позитивное влияние на развитие плаценты морской свинки по сравнению с плацентой приматов может также оказывать более высокий уровень метионина, который служит источником метильных групп биосинтеза нуклеотидов, ДНК, фосфолипидов [20].

Дополнительную роль в развитии плаценты морских свинок, вероятно, играет и повышенный уровень дикарбоновых аминокислот – глутаминовой и аспарагиновой, которые участвуют в синтезе других аминокислот, нуклеиновых кислот, ряда биоактивных соединений, в регуляции ферментативных реакций, сопряженных с циклом трикарбоновых кислот. Дикарбоновые аминокислоты участвуют также в регуляции буферных систем, в которых они выполняют функции анионов [12]. Можно предположить, что эти отличия вносят определенный вклад в обеспечение полноценного развития плаценты и внутриутробного развития плода морской свинки за весьма короткую длительность гестации.

Уровень содержания свободных треонина, глутамина, аланина, серина в разных частях плаценты обезьяны, напротив, превышает аналогичные величины у морской свинки (на 30.0–42.1% и 30.0–68.4% соответственно). Сходные отличия в содержании указанных аминокислот установлены и для тканей человека по сравнению с соответствующими показателями у морской свинки. Более высокие концентрации четырех аминокислот в плацентах обезьяны и человека, особенно в плодовой части, по сравнению с таковыми в плаценте морской свинки с учетом их метаболических функций [5, 8], по-видимому, могут оказывать некоторое положительное влияние на общий азотистый обмен в ворсинах трофобласта, являющихся основной структурной составляющей гемохориальной плаценты приматов.

Статистически значимые отличия в тканях плаценты человека и животных характерны также для содержания связанных фракций некоторых аминокислот (рис. 2). Так, в плодовой и материнской частях плаценты обезьяны и человека доля связанных диаминокислот от общего их уровня выше, чем в аналогичных тканях морской свинки. Величины связанного лизина в плодовой части плаценты обезьяны и человека превышают таковые у морской свинки на 62.4 и 69.9%, в а материнской части – на 47.5 и 54.2% соответственно. Для связанного гистидина в плодовой части плаценты обезьяны и человека увеличение составляет соответственно 44.3 и 67.2%, в материнской части – 44.2 и 34.9% относительно его показателей у морской свинки. Более низкий уровень у морской свинки гистидина, содержащего имидазольную группу, может понижать защищенность ряда участков полипептидной цепи к действию протеолитических ферментов, повреждающих структуру белков. Для связанных дикарбоновых аминокислот наблюдается противоположная направленность различий. Так, концентрация связанной формы аспарагиновой кислоты в плодовой части плаценты обезьяны на 46.4%, а у человека на 35.3% ниже, чем у морской свинки. Уровень этой аминокислоты в материнской части плаценты обезьяны и человека снижен на 38.7 и 27.2% соответственно относительно аналогичной величины у морской свинки. Отличие в содержании противоположно заряженных связанных аминокислот, возможно, обусловлено особенностями структуры белков в указанных тканях. Следует отметить, что, в свою очередь, даже незначительные модификации в содержании связанных аминокислот могут отражаться на различных уровнях структуры белков. В частности, отличия в содержании связанных форм незаряженных полярных аминокислот – треонина, серина, глутамина, а также гидрофобных – метионина, аланина, валина и лейцина, по-види-

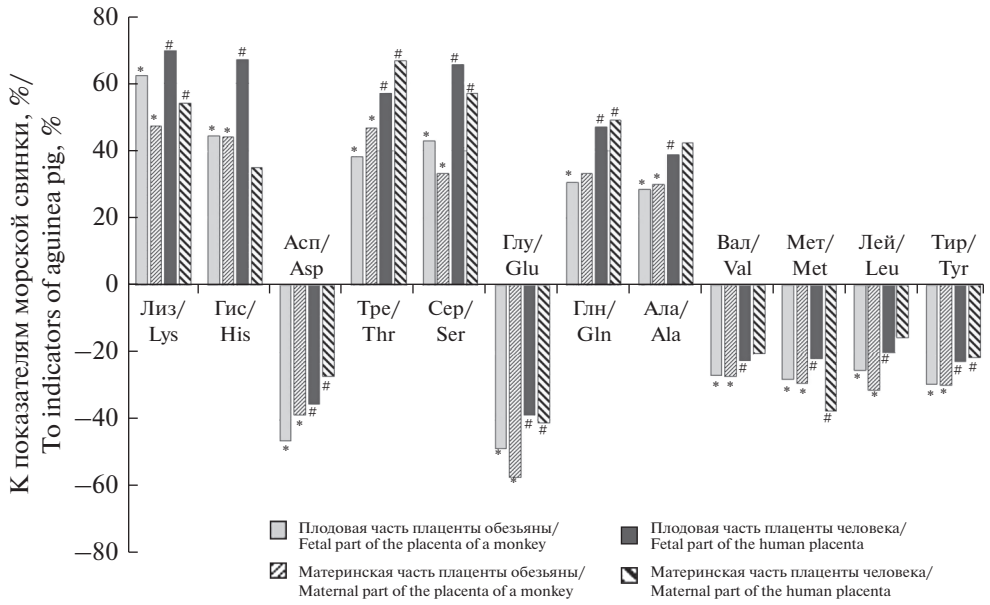

Рис. 2. Отличия содержания связанных аминокислот в тканях плаценты приматов относительно показателей у морской свинки.

Fig. 2. Differences in the content of bound amino acids in Primate placental tissues relative to those in guinea pigs.

мому, по-разному влияют на степень электростатических взаимодействий и количество водородных связей в белках [21]. Эти особенности сказываются на степени спирализации и растворимости белков [22] и, следовательно, их функциональной активности, отражаясь на всем метаболизме плацент исследованных объектов.

Общим для всех тканей последа является высокий уровень глутаминовой кислоты, особенно ее свободной формы. Этот факт, очевидно, обусловлен важной ролью глутаминовой кислоты в метаболизме трофобласта. Установлено, что 25% дыхания митохондрий плаценты человека поддерживается за счет ее окисления [23]. Кроме того, для глутаминовой кислоты в отличие от других аминокислот обнаружено интенсивное поглощение плацентой из крови пуповины. Высоким содержанием отличается также аспарагиновая кислота, выполняющая важные функции в аминокислотном обмене.

Что касается активности изученных ферментов, то для большинства из них она отличается в разных тканях плаценты животных и человека (табл. 3, рис. 3). Максимальная активность изученных ферментов, как и аминокислот, обнаруживается в фетальной части плаценты.

Наряду с межтканевыми различиями ферментативной активности определенные отличия имеют место и для аналогичных тканей разных видов животных и человека. Уровень активности ГДГ, АЛТ, Цис-Т, ГКТ, ГС увеличен в тканях плаценты обезьяны и человека относительно таких же частей плаценты морской свинки. Очевидно высокая активность ГС в плаценте приматов, особенно человека, способствуют более эффективной детоксикации аммиака – процесса важного для всего азотистого обмена. Активность АСТ, Тир-Т, ФАГ, напротив, выше в тканях последа морской свинки. Определенную взаимосвязь между показателями активности ферментов и содержанием свободных аминокислот подтверждают результаты корреляционного анализа. Позитивная корреляционная зависимость выявлена

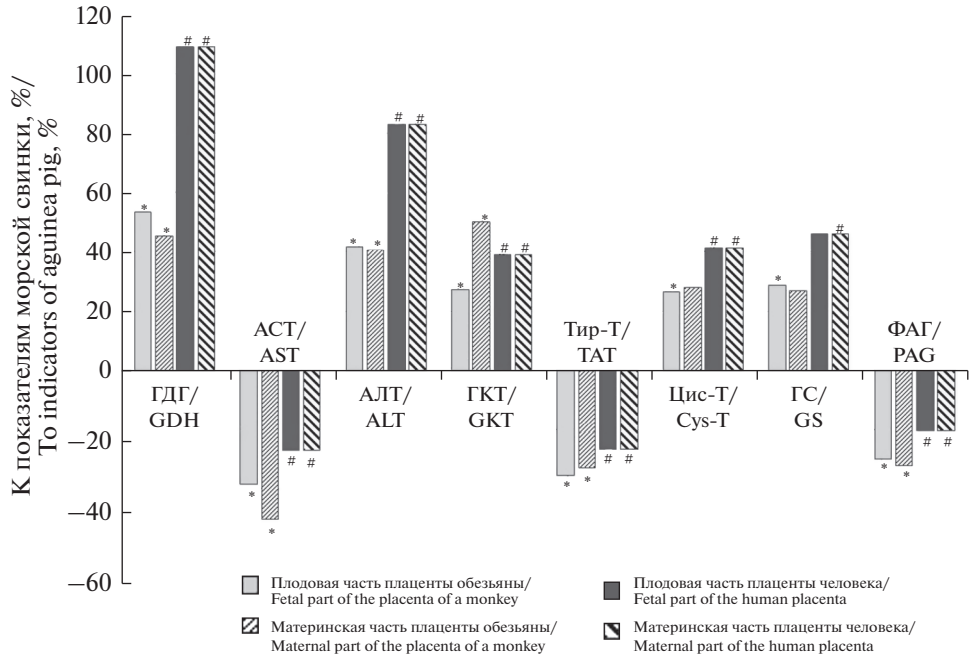

Рис. 3. Отличия активности ферментов аминокислотного обмена плаценты приматов относительно показателей у морской свинки.

Принятые на рис. 3 сокращения: ГДГ – глутаматдегидрогеназа, АСТ –аспартатаминотрансфераза, АЛТ – аланинаминотрансфераза, ГКТ – глутамин-кетокислотная аминотрансфераза, Тир-Т – тирозинаминотрансфераза, Цис-Т – цистеинаминострансфераза, ГС – глутаминсинтетаза, ФАГ – фосфат-активируемая глутаминаза.

Fig. 3. Differences in the activity of enzymes of amino acid metabolism of the placenta of primates relative to those in the guinea pig.

Abbreviations in Fig. 3: GDH – glutamatedehydrogenase, AST – aspartate aminotransferase, ALT – alanine aminotransferase, GKT – glutamine-ketoacid transaminase, Tyr-T – tyrosine transaminase, Cys-T – cysteine transaminase, GS – glutamine synthetase, PAG – phosphate-activated glutaminase.

между активностью АСТ, АЛТ и уровнем свободных аспарагиновой аминокислоты ($r = 0.83; 0.81; 0.80$) и аланина ($r = 0.85; 0.83; 0.81$) соответственно в тканях плаценты человека, обезьяны и морской свинки (во всех случаях статистическая значимость связи $p < 0.01$). Негативная зависимость выявлена для глутаминовой кислоты и активности ГДГ. Коэффициенты корреляции между ними находятся в пределах от –0.83 до –0.86, $p < 0.01$.

Более низкая активность в тканях последа морской свинки ГДГ, катализирующей окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты, очевидно, является основной причиной повышенного уровня этой аминокислоты по сравнению с аналогичными тканями у других объектов. Еще одной причиной, объясняющей высокий уровень глутаминовой кислоты, по-видимому, является повышенная активность в плаценте морской свинки глутаминазы (ФАГ), параллельно приводящей к уменьшению количества глутамина. Помимо этого фермента в регуляции содержания глутамина принимают участие реакции, связанные с его синтезом и трансаминированием (ГС и ГКТ), активность которых у морской свинки снижена относительно таковых у обезьяны и человека. Важно подчеркнуть, что поскольку глутамин более необходим для роста клеток, чем любая другая аминокислота [24], в

Таблица 3. Активность ферментов аминокислотного обмена в плаценте разных видов животных и человека
Table 3. Activity of amino acid metabolism enzymes in the placenta of different animal and human species

Ферменты, нмоль/мин мг белка Enzymes, nmol/min mg of protein	Морская свинка Guinea pig $n = 36$		Обезьяна Monkey $n = 9$		Человек Human $n = 32$	
	плодовая часть плаценты fetal part of placenta	материнская часть плаценты maternal part of placenta	плодовая часть плаценты fetal part of placenta	материнская часть плаценты maternal part of placenta	плодовая часть плаценты fetal part of placenta	материнская часть плаценты maternal part of placenta
Глутаматдегидрогеназа Glutamatedehydrogenases	2.36 ± 0.12	1.79 ± 0.08	3.62 ± 0.23 $p_1 < 0.001$	2.61 ± 0.16 $p_1 < 0.05$	4.94 ± 0.54 $p_2 < 0.001$	3.51 ± 0.36 $p_2 < 0.001$
Аспартатаминотрансфераза Aspartate aminotransferase	5.73 ± 0.39	4.05 ± 0.33	3.52 ± 0.25 $p_1 < 0.001$	2.02 ± 0.15 $p_1 < 0.05$	4.18 ± 0.27 $p_2 < 0.001$	2.74 ± 0.16 $p_2 < 0.05$
Аланинтрансфераза Alanine aminotransferase	0.77 ± 0.04	0.42 ± 0.02	1.09 ± 0.06 $p_1 < 0.001$	0.59 ± 0.04 $p_1 < 0.05$	1.41 ± 0.11 $p_2 < 0.001$	0.78 ± 0.04 $p_3 < 0.001$
Глутамин-кетокислотная аминотрансфераза Glutamine-ketoacid transaminase	0.59 ± 0.04	0.38 ± 0.02	0.75 ± 0.04 $p_1 < 0.05$	0.57 ± 0.04 $p_1 < 0.01$	0.82 ± 0.05 $p_2 < 0.001$	0.61 ± 0.04 $p_2 < 0.001$
Тирозинаминотрансфераза Tyrosine aminotransferases	0.79 ± 0.05	0.52 ± 0.03	0.51 ± 0.04 $p_1 < 0.001$	0.35 ± 0.02 $p_1 < 0.01$	0.58 ± 0.04 $p_2 < 0.001$	0.38 ± 0.02 $p_2 < 0.05$
Цистеинаминотрансфераза Cysteine transaminase	0.34 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.43 ± 0.03 $p_1 < 0.05$	0.32 ± 0.02 $p_1 > 0.05$	0.48 ± 0.03 $p_2 < 0.001$	0.39 ± 0.03 $p_2 < 0.001$
Глутаминсинтетаза Glutamine synthetase	1.39 ± 0.11	1.16 ± 0.07	1.79 ± 0.12 $p_1 < 0.05$	$1..47 \pm 0.09$ $p_1 > 0.05$	2.03 ± 0.12 $p_2 > 0.05$	1.60 ± 0.11 $p_2 < 0.05$
Фосфат-активируемая глутаминаза Phosphate-activated glutaminase	1.78 ± 0.11	1.43 ± 0.09	1.25 ± 0.07 $p_1 < 0.001$	0.97 ± 0.06 $p_1 < 0.001$	1.42 ± 0.10 $p_2 < 0.05$	1.07 ± 0.06 $p_2 < 0.05$

плаценте человека с наиболее высоким его уровнем создаются оптимальные условия для трофики плода. Около 20% азота плода приходится именно на глутамин [25].

Что касается активности других аминотрансфераз: АСТ, АЛТ, Цис-Т и Тир-Т, то, судя по прямой корреляционной зависимости между ними и уровнем аминокислот-субстратов, можно полагать наличие причинно-следственных взаимоотношений между этими показателями. Однако следует учитывать, что наряду с модификациями активности ферментов, различия в содержании аминокислот у представителей гемохориального типа плаценты зависят также от интенсивности плацентарного транспорта, степени анаболизма и катаболизма белков и других причин [28, 29].

Резюмируя полученные данные, следует подытожить, что гемохориальная плацента разных видов животных и человека имеет как межвидовые и межтканевые отличия в аминокислотном обмене, так и сходные особенности в содержании и активности изученных показателей, определяющие специфику органа независимо от межвидовых особенностей. Во всех исследованных объектах наибольшим содержанием свободных и связанных аминокислот характеризуется плодовая часть плаценты, играющая ведущую роль во взаимосвязи между организмами матери и плода. Такая же ситуация имеет место и для активности ферментов аминокислотного обмена. Кроме того, максимальная концентрация аминокислот во всех случаях приходится на долю дикарбоновых аминокислот, в значительной степени ответственных за особенности азотистого метаболизма и реакции, связывающие его с другими видами обмена.

Межвидовые отличия аналогичных частей плаценты касаются содержания отдельных аминокислот. Более высокий уровень большинства аминокислот, особенно свободных, установлен в плаценте морской свинки. Между плацентами человека и обезьяны различия изученных биохимических показателей менее выражены и зачастую статистически не значимы. В связи с этим на рисунках приведено сопоставление содержания аминокислот и активности ферментов только между морской свинкой и приматами. Важным отличием плаценты морской свинки (от других объектов исследования) является неодинаковое связывание аминокислот с биополимерами, меняющее состояние акцепторных групп белков. В зависимости от физико-химических свойств аминокислот: полярности, гидрофильности или гидрофобности, заряженности, они по-разному влияют на различные уровни структуры белков и, следовательно, на их регуляторные возможности. Аналогичные ткани последа разных видов животных и человека отличаются и активностью ферментов аминокислотного обмена: для некоторых из них она максимальна у человека, а для других – у морской свинки. Между активностью ферментов и содержанием соответствующих свободных аминокислот имеется тесная корреляционная зависимость, свидетельствующая об их роли в формировании плацентарного аминокислотного фонда и, следовательно, в обеспечении трофических потребностей плода и всего фетоплацентарного комплекса.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено за счет средств госбюджета.

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента: Погорелова Т.Н.

Сбор данных: Никашина А.А., Аллилуев И.А.

Обработка данных: Гунько В.О, Никашина А.А.

Написание и редактирование статьи: Погорелова Т.Н., Гунько В.О.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Уход за животными осуществляли согласно рекомендациям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”, международных рекомендаций “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (The European Convention, 1986). Протокол экспериментального исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИАП.

Информированное согласие на использование биоматериала для научных исследований было получено от всех пациенток. Исследования проводились в соответствии с принципами, обозначенными в Хельсинской Декларации (2000 г.) и протоколе Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999 г.), и также одобрено локальным этическим комитетом НИИАП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Burton G.J., Jauniaux E.* What is the placenta? Am. J. Obstet, Gynecol. 213(4 Suppl): S6.e1–S8. 2015. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.050
2. *Maltepe E., Fisher S.J.* Placenta: the forgotten organ. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 31: 523–552. 2015. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125620
3. *Costa M.A.* The endocrine function of human placenta: an overview. Reprod. Biomed. Online. 32(1): 14–43. 2016. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.10.005
4. *Kalhan S.C.* Protein metabolism in pregnancy. Am. J. Clin. Nutr. 71(5 Suppl): 1249S–1255S. 2000. https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1249s
5. *Duggleby S.L., Jackson A.A.* Protein, amino acid and nitrogen metabolism during pregnancy: how might the mother meet the needs of her fetus? Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 5(5): 503–509. 2002. https://doi.org/10.1097/00075197-200209000-00008
6. *Sladek S.M., Magness R.R., Conrad K.P.* Nitric oxide and pregnancy Am. J. Physiol. 272(2 Pt 2): R441–R463. 1997. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.272.2.R441
7. *Cohen S.S.* A guide to the polyamines. New York. Oxford Univers. Press. 1998.
8. *Bröer S., Bröer A.* Amino acid homeostasis and signaling in mammalian cells and organisms. Biochem. J. 474(12): 1935–1963. 2017. https://doi.org/10.1042/BCJ20160822
9. *Manta-Vogli P.D., Schulpis K.H., Dotsikas Y., Loukas Y.L.* The significant role of amino acids during pregnancy: nutritional support. J. Matern. Fetal. Neonatal. Med. 33(2): 334–340. 2020. https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1489795
10. *Barker D.J., Thornburg K.L.* Placental programming of chronic diseases, cancer and lifespan: a review. Placenta. 34(10): 841–845. 2013. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.07.063
11. *Elliott K.A., Khan R.T., Bilodeau F., Lovell R.A.* Bound gamma-aminobutyric and other amino acids in brain. Can. J. Biochem. 43: 407–416. 1965. https://doi.org/10.1139/o65-048
12. *Sanderson C., Murphy S.* Glutamate binding in the rat cerebral cortex during ontogeny. Brain Res. 254 (3): 329–339. 1981. https://doi.org/10.1016/0165-3806(81)90042-0
13. *Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Каушанская Л.В., Аллилуев И.А., Ларичкин А.В.* Модификация связывания аминокислот с цитоплазматическими белками плаценты при осложненной беременности. Рос. вестник акушера-гинеколога. 19(6): 5–10. 2019. [*Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Kaushanskaya L.V., Alliluev I.A., Larichkin A.V.* Modification of binding of amino acids with placental cytoplasmic proteins in complicated pregnancy. Ross. Vestnik Akushera-Ginekologa. 19(6): 5–10. 2019. (In Russ)]. https://doi.org/10.17116/rosakush2019190615
14. Methods of Enzymatic Analysis, V.2. Ed. *H.U. Bergmeyer.* New York. Acad. Press. 2012.
15. *Погорелова Т.Н., Линде В.А., Крукиер И.И., Гунько В.О., Друккер Н.А.* Молекулярные механизмы регуляции метаболических процессов в плаценте при физиологически протекающей и осложненной беременности. Санкт-Петербург. Гиппократ. 2012. [*Pogorelova T.N., Linde V.A., Krukier I.I., Gunko V.O., Drukker N.A.* Molekuljarnye mehanizmy reguljacii metabolicheskih processov v placente pri fiziologicheski protekajushhej i oslozhnennoj beremennosti [Molec-

ular mechanisms of regulation of metabolic processes in the placenta with physiologically occurring and complicated pregnancy]. Saint-Petersburg. Hippocrates. 2012. (In Russ)].
16. *Morgan D.M.* Polyamines. An overview. Mol. Biotechnol. 11(3): 229–250. 1999. https://doi.org/10.1007/BF02788682
17. *Zwierzchowski L., Członkowska M., Guszkiewicz A.* Effect of polyamine limitation on DNA synthesis and development of mouse preimplantation embryos in vitro. J. Reprod. Fertil. 76(1): 115–121. 1996. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0760115
18. *Moore J.J., Cardaman R.C., Lundgren D.W.* Spermine-enhanced protein phosphorylation in human placenta. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 176(3): 313–321. 1984. https://doi.org/10.3181/00379727-176-41877
19. *Li L., Rao J.N., Bass B.L., Wang J.Y.* NF-kappaB activation and susceptibility to apoptosis after polyamine depletion in intestinal epithelial cells. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 280(5): G992–G1004. 2001. https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.5.G992
20. *Dasarathy J., Gruca L.L., Bennett C., Parimi P.S., Duenas C., Marczewski S., Fierro J.L., Kalhan S.C.* Methionine metabolism in human pregnancy. Am. J. Clin. Nutr. 91(2): 357–365. 2010. https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28457
21. Proteins: Structure and function. Ed. *J.J. L'Italien*. New York. Plenum press. 2012.
22. *Kessel A., Ben-Tal N.* Introduction to proteins: structure, function, and motion. Boca Raton: CRC Press. 2010.
23. *Broeder J.A., Smith C.H., Moe A.J.* Glutamate oxidation by trophoblasts in vitro. Am. J. Physiol. 267(1 Pt 1): C189–C194. 1994. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.1.C189
24. *Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Линде В.А.* Дисбаланс системы глутамин-глутаминовая кислота в плаценте и околоплодных водах при плацентарной недостаточности. Биомед. химия. 60 (5): 596–601. 2014. [*Pogorelova T.N., Gunko V.O., Linde V.A.* Imbalance of system of glutamin – glutamic acid in the placenta and amniotic fluid at placental insufficiency. Biomed. Khim. 60(5): 596–601. 2014. (In Russ)]. https://doi.org/0.18097/pbmc20146005596
25. *Lager S., Powell T.L.* Regulation of nutrient transport across the placenta. J. Pregnancy. 2012: 179827. 2012. https://doi.org/10.1155/2012/179827

Comparative Characteristic Amino Acid Composition and Activity of Enzymes of Amino Acid Metabolism in Hemochorial the Placenta of Different Animal Species and Humans

T. N. Pogorelova[a], *, V. O. Gunko[a], A. A. Nikashina[a], and I. A. Alliluev[b]

[a] *Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia*
[b] *Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia*
**e-mail: tnp.rniiap@yandex.ru*

The amino acid composition and activity of the enzymes of the amino acid metabolism of placenta were studied. The objects of the study were guinea pigs (*Cavia porcellus*) and rhesus macaques (*Macaca mulatta*), which have a hemochoric placenta type, similar to humans. The study also included women with uncomplicated pregnancy and delivery on time (39–40 weeks). It was found that in the all tissues studied, the fetal part of the placenta is characterized by the highest content of free and bound amino acids. In the fetal part of the placenta, the maximal activity of amino acid metabolism enzymes (aminotransferases, deaminases, amino synthetases) was also found. Common to the placenta of guinea pigs, monkeys and humans is also a high level of dicarboxylic amino acids and glutamine. Along with the common features in the amino acid metabolism of the placenta of different species of animals and humans, some differences were revealed due to the evolutionary features of the development of the organ, the specifics of the existing maternal-fetal relationships. Interspecies differences of the same parts of the placenta relate to individual amino acids, the majority of which in the placenta of rodents exceeds similar indicators in primates. Between the placentas of humans and monkeys, the differences in the studied biochemical parameters are less pronounced. Another difference between guinea pig placenta and human and monkey placenta is the unequal non-cova-

lent binding of amino acids to biopolymers, which modifies the state of the acceptor groups of proteins. Similar tissues of the afterbirth of different species of animals and humans differ in the activity of amino acid metabolism enzymes. There is a close correlation between the content of free amino acids and indicators of enzyme activity, showing their important role in the formation of the placental amino acid fund.

Keywords: hemochorial placenta, primates, rodents, amino acid metabolism

ЦИТИРОВАТЬ:

Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Аллилуев И.А. Сравнительная характеристика аминокислотного состава и активности ферментов аминокислотного обмена в гемохориальной плаценте разных видов животных и человека. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 107(2): 243–257. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020072

TO CITE THIS ARTICLE:

Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Alliluev I.A. Comparative Characteristic Amino Acid Composition and Activity of Enzymes of Amino Acid Metabolism in Hemochorial the Placenta of Different Animal Species and Humans Russian Journal of Physiology. 107(2): 243–257. 2021.

DOI: 10.31857/S0869813921020072

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2021, том 107, № 2, с. 258–264

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ (2021 г.)

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

Лучшие статьи по нейробиологии переводятся на английский язык редакцией (или самими авторами) и публикуются в Neuroscience and Behavioral Physiology (ISSNp: 0097-0549, ISSNe: 1573-899X). Лучшие статьи других областей физиологии переводятся для журнала Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology (ISSNp: 0022-0930, ISSNe: 1608-3202), индексируемого в WoS (Импакт фактор =0.382; 2019 г.)

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

Подача статей на русском либо на английском языке производится в электронном виде через систему OJS (open journal systems) на сайте журнала.

При подаче статьи авторы гарантируют следующее:

- материалы не были опубликованы ранее и не рассматриваются в других изданиях;
- Текст статьи является оригинальным, не содержит плагиата и самоплагиата, заимствований без разрешений автора/издательств;
- авторы знают и соблюдают этические нормы, предписанные международными соглашениями о публикациях научных статей (COPE);
- при выполнении работ авторы соблюдали международные правила проведения исследований с участием человека и/или животных;
- текст статьи одобрен всеми авторами перед подачей в редакцию, каждый соавтор согласен на авторство в данной статье, вклад каждого соавтора в статью указан;
- авторами представлена полная информация о потенциальных конфликтах интересов.

СТРУКТУРА РУКОПИСИ

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

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

ОСНОВНЫЕ РАЗДЕЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СТАТЬИ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Уровень вероятности указывайте, исходя из следующих правил:

• При $0.01 \le p \le 1.00$ – указывайте p с точностью до сотых (допустимо писать $p > 0.05$; $p < 0.05$);

• При $0.001 \le p < 0.01$ – пишите $p < 0.01$;

• При любых $p < 0.001$ – пишите $p < 0.001$.

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

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

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

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

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

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

рируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи".

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

В статье может быть выделен раздел **Благодарности,** где приводятся сведения о лицах, способствовавших проведению работы. Данный раздел не включает информацию об источниках финансирования.

Список литературы. Список литературы составляется только по цитированным в тексте работам. Правила цитирования и оформления списка литературы даны в специальном разделе. Все литературные источники, процитированные в статье, должны быть доступны.

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

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

ТРЕБОВАНИЯ К ОБЗОРНОЙ СТАТЬЕ

В обзорной статье не выделяют в самостоятельные разделы Методы исследования, Результаты исследования, Обсуждение результатов. Все остальные разделы те же, что и для экспериментальной статьи. Текст обзора подразделяется на основе смысловых блоков. Во введении авторы должны сформулировать, в чем новизна представленного обзора и какие задачи они ставят в рамках данного обзора. Основной акцент в статье должен быть сделан на критическом рассмотрении экспериментальных работ, опубликованных в последнее десятилетие. Избыточные исторические экскурсы, пересказ ранее опубликованных обзоров не приветствуются. Следует приводить только необходимые ссылки. В обзорной статье должно присутствовать заключение, содержащее авторскую оценку ближайших перспектив изучения данной проблемы.

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

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ИЛЛЮСТРАЦИЙ И ТАБЛИЦ

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

Технические требования к подготовке электронных файлов иллюстраций подробно изложены на сайте издательства Pleiades Publishing.

Рисунки. Все обозначения на рисунках должны приводиться на английском языке в едином стиле. Независимо от типа графики, рисунок должен обладать высоким реальным разрешением. Возможно предоставление векторной графики. Линии на рисунках/графиках должны быть не менее 0.3 пунктов (point) в толщину.

Следует избегать слишком мелких обозначений (букв, цифр, значков). Подписи к рисункам приводятся на русском языке. Там, где необходимо, дается перевод обозначений, используемых на самом рисунке.

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

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

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

Таблицы. Заголовок таблицы должен иметь номер и название, все строки и столбцы должны быть озаглавлены. Сноски должны располагаться в строке примечания внизу таблицы. Таблицы готовятся с использованием средств редактирования таблиц MS Word, вставлять таблицы как рисунок нельзя. В тексте статьи таблицы приводятся на русском языке, в конце статьи в разделе для переводчика дается англоязычный вариант таблиц.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ССЫЛОК И СПИСКА ЛИТЕРАТУРЫ

Редакция *настоятельно рекомендует* ссылаться на англоязычные работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в основных международных базах данных (Pubmed, Web of Science, Scopus). При цитировании переводных источников рекомендуется ссылаться на англоязычную версию. При цитировании публикаций в российских журналах, имеющих переводную версию, следует ссылаться исключительно на англоязычную версию. Включение цитат в текст статей допускается только из первоисточника и только на языке оригинала.

Редакция *не рекомендует* ссылаться на локальные журналы и вестники, диссертации, авторефераты диссертаций, тезисы докладов, учебники, статьи в печати, устные сообщения. Редакция также *не приветствует* избыточное самоцитирование.

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

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

В списке литературы ссылки приводятся в порядке цитирования, с указанием DOI для статей.

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

2. Evans C.E., Thomas R.S., Freeman T.J., Hvoslef-Eide M., Good M.A., Kidd E.J. (2019) Selective reduction of APP-BACE1 activity improves memory via NMDA-NR2B

receptor-mediated mechanisms in aged PDAPP mice. Neurobiol Aging 75:136–149. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.11.011

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

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

При оформлении ссылок на русскоязычные источники, не имеющие полного перевода, информация должна быть дублирована на английский язык или транслитерирована (написана латинскими буквами). Для транслитерации текста в соответствии со стандартом BGN можно воспользоваться ссылкой http://ru.translit.ru/?account=bgn.

Пример оформления ссылок на российские издания:

1. Рубина К.А., Ткачук В.А. (2017) Молекулярные и клеточные механизмы физиологического и опухолевого роста кровеносных сосудов. Рос. физиол. журн. им И.М. Сеченова 103: 121–137. [Rubina K.A., Tkachuk V.A. (2017) Molecular and cellular mechanisms of angiogenesis in physiological and pathological conditions. Russ. J. Physiol. 103: 121–137. (In Russ)]. https://doi.org/10.7868/S0869813918090010

2. Крылов В.В. (ред) (2019) Хирургия сложных аневризм головного мозга. М. АБВ-пресс. [Krylov V.V. (ed) (2019) Khirurgiya slozhnykh anevrizm golovnogo mozga [Surgery of complex brain aneurysms]. M. ABV-press. (in Russ)].

ЛИЦЕНЗИОННЫЙ ДОГОВОР

К рассмотрению принимаются только статьи, к которым приложен лицензионный договор. Шаблон договора можно скачать на сайте журнала в разделе для авторов. Договор, подписанный и заполненный всеми авторами, необходимо загрузить как pdf-файлы при подаче статьи. Если Ваша статья будет отобрана для перевода в Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, то редакция попросит Вас заполнить дополнительный лицензионный договор для печати переводной версии статьи.

ПОДАЧА МАТЕРИАЛОВ НА САЙТЕ

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

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

2. Подписанный всеми авторами лицензионный договор (в формате *.pdf).

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

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

6. По желанию авторы могут привести исходные данные для описания исследования в качестве дополнительных материалов.

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

ПОРЯДОК РАССМОТРЕНИЯ СТАТЬИ

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

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

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

По результатам рецензирования редактор принимает одно из четырех решений:

1) принять статью к публикации в настоящем виде;

2) принять статью с учетом устранения небольших замечаний;

3) отправить статью на доработку и повторное рецензирование;

4) отклонить статью.

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

Ответы на вопросы рецензентов (отдельным файлом) и **исправленная версия статьи с выделенными в тексте изменениями** подаются через сайт в разделе рецензирование/версии. Если ответы авторов не поступают в установленный срок, то статья считается снятой с рассмотрения по инициативе авторов.

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

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

Редакция журнала в своей деятельности следует этическим стандартам Международного Комитета по публикационной этике (COPE), регулирующим поведение всех вовлеченных в публикацию сторон, а именно: Авторов, Редакторов журнала, Рецензентов и Издателя.