

СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 4, 2021

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

ОБЗОРЫ

Ось кишечник–мозг и рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами как факторы регуляции эпилептогенеза

О. Е. Зубарева, Т. Б. Мелик-Касумов

273

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Влияние охлаждения на зависимость частота–сила, эффект потенциации паузой и частотно-зависимое ускорение релаксации в миокарде морской свинки

А. С. Аверин, Н. М. Захарова, С. В. Тарлачков

289

Инсулин⁺-клетки и основные транскрипционные факторы (Pdx1, MafA и Ngn3) в печени животных при экспериментальном моделировании сахарного диабета 1-го и 2-го типа

*М. Байкенова, В. А. Черешнев, К. В. Соколова, И. Ф. Гетте,
В. В. Емельянов, И. Г. Данилова*

300

Влияние наночастиц на основе оксида железа, модифицированных различными оболочками, на генерацию активных форм кислорода стимулированными клетками крови человека в условиях *in vitro*

*Я. Г. Торопова, М. Н. Горшкова, Д. С. Моторина, Д. В. Королев,
Ю. А. Скорик, Г. А. Шульмейстер, Е. Ю. Подъячева, А. Я. Багров*

310

Подавление малоновым диальдегидом и метилглиоксалем эндотелий-зависимой дилатации подвздошной артерии крыс, вызываемой увеличением кровотока

В. В. Ермишкин, Е. В. Лукошкова, А. М. Мелькумянц

320

Влияние обогащенной среды и социальной изоляции на условнорефлекторный страх у крыс, перенесших ранний провоспалительный стресс

И. В. Павлова, Н. Д. Брошевицкая

331

Особенности распределения кальретинин-иммунопозитивных нейронов в поясничном отделе спинного мозга кошки (*Felis catus*)

А. А. Вещицкий, П. Е. Мусиенко, Н. С. Меркулева

344

Contents

Vol. 57, No. 4, 2021

REVIEWS

The gut-brain axis and peroxisome proliferator-activated receptors
in the regulation of epileptogenesis

O. E. Zubareva, T. B. Melik-Kasumov

273

EXPERIMENTAL ARTICLES

Effect of cooling on force-frequency relationship, effect of rest potentiation,
and frequency-dependent acceleration of relaxation in the guinea pig myocardium

A. S. Averin, N. M. Zakharova, S. V. Tarlachkov

289

Insulin-positive cells and major transcription factors (Pdx1, MafA and Ngn3)
in the liver of animals in rat experimental models of type 1 and type 2 diabetes mellitus

*M. B. Baikenova, V. A. Chereshnev, K. V. Sokolova,
I. F. Gette, V. V. Emelyanov, I. G. Danilova*

300

Influence of Iron Oxide-Based Nanoparticles Modified by Different Shells
on the Generation of Reactive Oxygen Species in Stimulated Human Blood Cells *in vitro*

*Ya. G. Toropova, M. N. Gorshkova, D. S. Motorina, D. V. Korolev,
Yu. A. Skorik, G. A. Shulmeister, E. Yu. Podyacheva, A. Ya. Bagrov*

309

Malondialdehyde- and Methylglyoxal-Induced Suppression of Endothelium-Dependent
Dilation of the Rat Iliac Artery in Response to Elevation in Blood Flow

V. V. Ermishkin, E. V. Lukoshkova, A. M. Melkumyants

320

The influence of social isolation and enriched environment
on fear conditioning in adult rats exposed to neonatal proinflammatory stress

I. V. Pavlova, N. D. Broshevitskaya

331

Distribution of Calretinin-Immunopositive Neurons in the Cat Lumbar Spinal Cord

A.A. Veshchitskii, P. E. Musienko, N. S. Merkulyeva

344

ОСЬ КИШЕЧНИК–МОЗГ И РЕЦЕПТОРЫ, АКТИВИРУЕМЫЕ ПЕРОКСИСОМНЫМИ ПРОЛИФЕРАТОРАМИ КАК ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗА

© 2021 г. О. Е. Зубарева^{1,*}, Т. Б. Мелик-Касумов²

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

² Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

*e-mail: ZubarevaOE@mail.ru

Поступила в редакцию 11.03.2021 г.

После доработки 03.04.2021 г.

Принята к публикации 06.04.2021 г.

Несмотря на активно проводимые исследования, значительная часть больных эпилепсией страдает фармакорезистентными формами заболевания. Это делает актуальным поиск новых методов лечения. В последние годы активно обсуждается возможная роль кишечно-мозговых взаимодействий в патогенезе эпилепсии. Последние экспериментальные и клинические исследования показывают корреляцию баланса кишечной микробиоты и выраженности эпилептогенеза. При этом различные методы модификации состава микробиоты показывают существенное влияние на течение эпилепсии. Тем не менее, остается открытым вопрос основного рецепторного звена оси кишечник–мозг, выступающего в роли интерфейса между кишечными микроорганизмами и регуляторными системами организма.

Целью настоящего обзора является анализ путей и степени вовлеченности кишечной микробиоты в патогенез и саногенез эпилепсии. Среди таких путей выделены нервно-проводниковый, метаболитный, иммунный и эндокринный. Анализ полученных на сегодняшний день данных показывает существенную роль в этих процессах рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPARs). Экспрессия этих рецепторов в основных структурах оси кишечник–мозг, наличие их лигандов среди метаболитов представителей микробиоты, а также описанные для агонистов некоторых PPARs противосудорожная и/или нейропротекторная активность позволяют выдвинуть гипотезу о роли PPARs в организме в качестве упомянутого выше сигнального интерфейса в оси кишечник–мозг. Отдельно в работе рассматривается терапевтический потенциал агонистов PPARs при лечении эпилепсии.

Ключевые слова: эпилепсия, PPARs, ось кишечник–мозг, кишечная микробиота, блуждающий нерв, кишечные гормоны

DOI: 10.31857/S0044452921040070

ВВЕДЕНИЕ

Височная эпилепсия — одно из наиболее тяжелых и сложно поддающихся лечению неврологических заболеваний. Распространенность эпилепсии в развитых странах составляет примерно 50 случаев на 100 000 населения, в менее развитых — 100 и более случаев на 100 000 человек [1].

Несмотря на активно проводимые исследования, около 30% пациентов остаются нечувствительными к применяемой терапии, что делает чрезвычайно актуальным поиск новых методов лечения. В последние годы активно обсуждается роль питания и пищеварительной системы в патогенезе различных видов нервно-психической патологии [2, 4], включая эпилепсию [5–7].

Значительная часть исследований по данным вопросам сосредоточена на изучении роли кишечной микрофлоры в патогенезе нервных расстройств [2]. Было показано, что микробиота кишечника может влиять на когнитивные функции, настроение, уровень тревожности и депрессивности. Микробный дисбаланс может коррелировать с различными нейродегенеративными расстройствами — болезнью Альцгеймера [8, 9], болезнью Паркинсона [10–12], аутизмом [13], депрессией [14], рассеянным склерозом [15], а также предрасположенностью к припадкам при эпилепсии [16]. Выявлено, что частота судорожных припадков повышена у пациентов с сочетанной патологией — эпилепсией и синдромом раздраженного кишечника [17]. При этом установлено, что патогенез последнего практически всегда связан с негативными изменениями в балансе микро-

биоты кишечника (клинический метаанализ — [18]). С другой стороны, А. Peng и соавт. [19] показали, что у пациентов с фармакорезистентной эпилепсией значительно изменяется состав кишечной микрофлоры, у них существенно увеличиваются показатели видового разнообразия микробиоты (α -разнообразие), и отмечается увеличение содержания редких представителей. Содержание бифидобактерий и лактобацилл коррелирует с частотой приступов — их содержание выше у пациентов с четырьмя и менее судорогами в год по сравнению с больными, имеющими более частые приступы [19]. Изменения структуры микробиоты кишечника были выявлены также G. Хие и соавт. [20], обследовавшими 14 пациентов с рефрактерной эпилепсией и 30 здоровых испытуемых. Кроме того значительное улучшение качества жизни и снижение частоты судорог на 50% и более отмечалось у 28.9% пациентов с фармакорезистентной эпилепсией, получавших смесь из восьми видов бактерий: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Bifidobacterium lactis* (два штамма), *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophiles* [21].

Механизмы лечебных и побочных эффектов другого немедикаментозного метода лечения эпилепсии — кетогенной диеты — в последнее время также подвергаются значительному пересмотру в контексте кишечно-мозговых взаимодействий [22]. Предполагается, в частности, что существенное снижение поступления в организм перевариваемых углеводов при сохранении доли пищевых волокон при кетогенной диете может приводить к перестройке микробиома кишечника, в частности, к уменьшению доли дрожжеподобных и плесневых грибов. Умеренное ограничение потребления белков при такой диете в свою очередь может снижать долю гнилостных и условно-патогенных бактерий. Тем не менее отмечены и случаи негативных изменений микробиоты кишечника в случае кетогенной диеты [6, 23], выражающиеся в снижении доли полезных для здоровья бактерий, потребляющих клетчатку. Эти нарушения объясняются, вероятно, существенными для микробиома различиями в рационе, прежде всего пониженным содержанием в нем пищевых волокон и высоким содержанием насыщенных жирных кислот [24]. Изменение баланса микробиоты кишечника при кетогенной диете может существенно сказываться на ее эффективности [25]. Совместное использование курсового введения *Lactobacillus fermentum* MSK 408 кетогенной диеты усиливает защитные свойства последней в мышинной модели пентилентетразоловых судорог [26].

Данный обзор посвящен описанию основных механизмов, которые могут опосредовать влияние кишечной микробиоты и других компонентов пищеварительной системы на развитие эпилептических изменений в мозге. При этом особое внимание будет

уделено рецепторам, активируемым пероксисомными пролифераторами, в связи с широкой вовлеченностью этих рецепторов в механизмы реализации кишечно-мозговых взаимодействий и перспективностью использования агонистов данных рецепторов для лечения фармакорезистентных форм эпилепсии.

I. ОСЬ КИШЕЧНИК–МОЗГ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭПИЛЕПСИИ: МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОБЛЕМЫ

Одним из методических подходов при изучении роли кишечной микробиоты в формировании нервно-психической патологии и, в частности, эпилепсии, является использование “стерильных” (свободных от микробов, англ. *germ-free*, GF) мышей. С помощью данной модели было показано влияние послеродовой микробной колонизации на формирование уровня тревожности [27, 28], мозговых механизмов стресс-реакции [29] и нейропластичности [28]. R. Конно и соавт. [30] показали, что у GF-мышей снижается уровень циркулирующего d-аланина, являющегося коагонистом NMDA-глутаматных рецепторов, после инокуляции бактерий его уровень восстанавливается. Роль NMDA-рецепторов в развитии эпилептических состояний была показана неоднократно [31, 32]. Было также показано, что состав микробиоты кишечника влияет на формирование и функциональную активность клеток миндалины [33–35] и гиппокампа [35] — как известно, это структуры мозга непосредственно вовлечены в патогенез эпилепсии. Нарушения развития нервной системы у GF-мышей отмечаются не только в центральном, но и периферическом (энтеральном) отделе: в возрасте P3 у них выявляются морфологические изменения в ауэрбаховом сплетении тощей и подвздошной кишки, характеризующиеся снижением плотности нервных волокон, уменьшением количества нейронов в ганглиях и увеличением доли нитергических нейронов [36], что может влиять на активность вегетативной нервной системы и, как следствие, на развитие эпилептических процессов в мозге.

Другой методический подход — трансплантация фекальной микробиоты — используется как в доклинических, так и в клинических исследованиях. Было показано, что трансплантация фекальной микробиоты от здоровых к психически больным людям приводила к уменьшению у последних депрессивных и тревожных симптомов. Также обнаружено и обратное — усиление депрессивных и тревожных симптомов в результате трансплантации микробиоты от психически больных доноров здоровым реципиентам [обзор — [37]]. Z. Не и соавт. сообщают об успешном применении данного метода при лечении пациентки с болезнью Крона и эпилепсией. Трансплантация фекальной микрофлоры привела не только к ремиссии кишечных на-

рушений, но и позволила предотвратить рецидивы приступов после отмены противосудорожных препаратов [38].

Для изменения состава кишечной микрофлоры применяют также антибиотики. Bercik и соавт. [39] вводили мышам смесь из антибиотиков неомицина, бацитрацина и пимарицина, что приводило к существенному изменению видового состава микробиоты. У экспериментальных мышей наблюдались нарушения исследовательского поведения в темно-светлой камере и изменения продукции в гиппокампе и миндалине нейротрофического фактора мозга (BDNF), вовлеченность которого в патогенез эпилепсии широко обсуждается в литературе [40].

Еще один методический подход в исследовании кишечно-мозговых взаимодействий заключается в хроническом введении экспериментальным животным пробиотиков (потенциально полезных представителей кишечной микробиоты) и пребиотиков (не перевариваемых пищевых волокон, стимулирующих рост полезных кишечных бактерий). Этот подход был использован при изучении действия микробиоты кишечника на нейромедиаторные системы мозга, вовлеченные в патогенез эпилепсии. Было показано, что *Bifidobacterium infantis* может влиять на метаболизм серотонина в мозге крыс [41]. При этом известно, что серотонин играет важную роль в патогенезе эпилепсии [42].

Интересны также исследования влияния про- и пребиотиков на состояние глутаматергической и ГАМК-ергической систем мозга, поскольку считается, что баланс этих нейромедиаторов играет ключевую роль в индукции судорожных состояний [43]. Исследование, проведенное с помощью магнитно-резонансной спектроскопии, показало, что хроническое введение *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) здоровым самцам мышей BALB приводит к увеличению уровня глутамата и глутамина (Glx), общего N-ацетиласпартата и N-ацетиласпартилглутаминовой кислоты (tNAA), а также ГАМК в головном мозге [44]. При этом ранее было показано, что уровень tNAA снижен у пациентов с височной эпилепсией [45]. Savignac и соавт. [46] исследовали эффекты хронического введения крысам фруктоолигосахаридов и галактоолигосахаридов — питательных веществ, являющихся субстратом для пробиотической микрофлоры кишечника — лактобацилл и бифидобактерий. Взрослые крысы, получавшие галактоолигосахариды, имели более высокие уровни белка субъединицы GluN1 NMDA-рецепторов в лобной коре и GluN2A-субъединицы в гиппокампе по сравнению с контрольными животными. Введение фруктоолигосахаридов увеличивало уровень GluN1 в гиппокампе. Williams и соавт. осуществляли ежедневное кормление новорожденных (P3–P21) крыс пребиотиком галактоолигосахаридом BGOS. В возрасте P22 они выявили увеличение экспрессии генов

субъединицы GluN2A NMDA-глутаматных рецепторов и мозгового нейротрофического фактора BDNF в гиппокампе. В отношении BDNF эффект наблюдался также на P56 (26 дней после прекращения кормления) [47]. С другой стороны, J. Bravo и соавт. [48] показали, что хроническое введение мышам *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) приводило к изменению экспрессии генов ГАМК-, B1b- и $\alpha\alpha 2$ -рецепторов в гиппокампе, коре и миндалине. Ключевая роль рецепторов ГАМК в патогенезе эпилепсии была описана неоднократно [обзор — [49]].

II. МЕХАНИЗМЫ, ОПОСРЕДУЮЩИЕ ВЛИЯНИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ НА МОЗГ

Среди возможных механизмов, опосредующих влияние кишечной микробиоты на мозг, можно выделить следующие основные пути: 1) нервно-проводниковый; 2) иммунный; 3) нейроэндокринный; 4) прямое влияние микробных метаболитов на нейроны мозга.

1) Нервнопроводниковый путь кишечно-мозговых взаимодействий

Нервнопроводниковый путь анатомически включает кишечную нервную систему (в частности, Мейснерово и Ауэрбахово сплетение), превертебральные ганглии, симпатические и парасимпатические нервы, вегетативные центры головного мозга.

Ключевую роль в данном пути играет блуждающий нерв (nervus vagus, вагус), его ядра (в первую очередь, ядро солитарного тракта) и его проекции в лимбические структуры мозга. Доказательства роли вагуса в кишечно-мозговых взаимодействиях были получены в следующих исследованиях. Было показано, что увеличение в слепой кишке концентрации микробного метаболита индола приводит к активации блуждающего нерва [50]. Ваготомия подавляет действие пребиотического олигосахарида грудного молока 2-фукозиллактозы на эффективность ассоциативного обучения и показатели долговременной потенциации в нейронах гиппокампа [51], а также нивелирует поведенческие эффекты введения *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) [48]. Введение данной бактерии в просвет тощей кишки увеличивает частоту спонтанного возбуждения афферентных волокон брыжеечных нервов [52]. Было показано также, что вагус опосредует положительные эффекты *Lactobacillus reuteri* на социальное поведение в генетической модели расстройства аутистического спектра (мыши Shank3B $-/-$) [53].

С другой стороны, еще в конце 19 века было доказано, что стимуляция вагуса (VNS-терапия) положительно влияет на больных эпилепсией, снижая вероятность возникновения эпилептических приступов и улучшая психоэмоциональное состояние пациентов [54]. В настоящее время использова-

ние данного метода в комплексном лечении эпилепсии и депрессивных состояний разрешено в Европейском союзе и Канаде [55]. Этот метод лечения применяется также в России и Беларуси. Механизмы положительных эффектов VNS-терапии до конца не известны, но предполагается, что они опосредуются изменениями, происходящими в корковых проекциях ядра солитарного тракта посредством повышения синаптической активности в клетках таламуса и таламокортикальных проекций, а также снижением синаптической активности в нейронах миндалины и гиппокампа [56].

Основным нейротрансмиттером вагусной афферентной сигнализации к ядру солитарного тракта является глутамат [57], однако множество других нейромедиаторов и нейропептидов также опосредуют кишечно-мозговые взаимодействия на уровне кишечной и вегетативной нервной систем. В частности, это предшественники и метаболиты триптофана, серотонин, ГАМК и катехоламины [33, 58], а также пептиды (холецистокинин, субстанция Р, пептид YY, глюкагоноподобный пептид-1, грелин, лептин) [59–61].

2) Роль иммунной системы в кишечно-мозговых взаимодействиях

В желудочно-кишечном тракте сосредоточено до 70% иммунных клеток организма, постоянно взаимодействующих с триллионами микробов, населяющих кишечник. В основном иммунные клетки сосредоточены в лимфоидной ткани кишечника. Они представлены Т- и В-лимфоцитами, макрофагами, тучными и дендритными клетками.

Исследования, проведенные на GF-мышьях, показали, что микробиота влияет на созревание иммунной системы хозяина, при этом введение *Bacteroides fragilis* нивелирует нарушения, наблюдаемые у GF-животных [63]. Специфическая микробиота направляет дифференцировку Т-хелперов, продуцирующих интерлейкин-17 (IL-17), в слизистой оболочке тонкой кишки [58]. Микробная колонизация кишечника GF-мышей приводит к индукции большого числа генов, участвующих в Т-клеточном иммунном ответе [64]. Дифференцировка регуляторных Т-лимфоцитов модулируется бутиратом — продуктом метаболизма пробиотической флоры кишечника, относящегося к короткоцепочечным жирным кислотам (англ. *Short chain fatty acids*, SCFA) [65].

Молекулярные механизмы, ответственные за взаимодействие микробиоты с клетками организма хозяина, включают в себя множество рецепторов распознавания образов, в том числе, Toll-подобные рецепторы (TLR), расположенные на мембранах иммунных клеток и клеток кишечника [66, 67].

Активация TLR четвертого типа (TLR4) приводит к индукции в иммунных клетках синтеза про-

воспалительных цитокинов, в частности, интерлейкинов 1 и 6 (IL-1, IL-6) и фактора некроза опухоли α (TNF α). Причем микробиота может влиять на изменение уровня провоспалительных цитокинов не только локально (в клетках кишечника), но и в крови, по крайней мере, при некоторых патологических состояниях. Исследование детей с неинфекционной диареей показало существенное увеличение в сыворотке их крови содержания IL-1, IL-6, TNF α и интерлейкина 17 (IL-17). При этом уровни IL-1, IL-6, IL-17 и TNF- α в сыворотке положительно коррелировали с численностью *E. coli* и *Enterococcus sp.* и отрицательно коррелировали с численностью *Bifidobacterium sp.* и молочнокислых бактерий в образцах фекалий [68]. Повышение уровня IL-1, IL-6 и TNF- α в крови приводит к усилению экспрессии аналогичных белков в глиальных клетках ЦНС, что в свою очередь может способствовать развитию эпилептических процессов [69, 70]. При этом показано, что с повышением уровня провоспалительных цитокинов в крови и мозге могут быть связаны не только развитие судорожной активности, но и появление характерных для эпилепсии нарушений социального и эмоционального поведения [71, 72].

3) Влияние микробиоты на гормональные системы организма

Можно выделить два основных уровня таких взаимодействий: первый связан с действием микробиоты на эндокринные клетки эпителиальной выстилки желудочно-кишечного тракта (энтероэндокринные клетки), производящие серотонин и кишечные пептиды, второй — с регуляцией активности гипоталамо-гипофизно-надпочечниковой оси.

Серотонин. Наиболее распространенные в желудочно-кишечном тракте энтероэндокринные клетки — энтерохромаффинные клетки. Они располагаются рядом с эпителием, выстилающим просвет пищеварительного тракта. Энтерохромаффинные клетки модулируют передачу сигналов нейронов в кишечной нервной системе посредством секреции серотонина и пептидов. Порядка 90% серотонина в организме производится в кишечнике [73]. Поскольку афферентные и эфферентные нервные волокна не выступают в просвет кишечника, энтерохромаффинные клетки необходимы для трансдукции сенсорного сигнала. Кишечный серотонин, действуя в синергии с другими пищеварительными гормонами, регулирует сенсорные и моторные желудочно-кишечные рефлексы. Кроме того, он обладает провоспалительным действием, воздействуя на рецепторы, расположенные на мембранах Т- и В-лимфоцитов и дендритных клеток (5-HT7Rs) [74–76]. Показано также влияние периферического серотонина на углеводный и липидный обмен [74, 77].

Кишечная продукция серотонина регулируется микробиотой, эффект может опосредоваться

SCFA-ацетатом и бутиратом [73, 78]. Действие микробиоты может носить не только локальный, но и системный характер. Существенное изменение в крови GF-мышей уровня индолсодержащих метаболитов, таких как индоксилсульфат и антиоксидант индол-3-пропионовая кислота (IPA), выявлено в исследовании, проведенном методом масс-спектрометрии. Интересно отметить, что производство IPA зависело от микрофлоры и могло быть скорректировано путем колонизации кишечника бактериями *Clostridium porogenes* [79].

Ряд данных указывает на возможное участие периферического и центрального пула серотонина в эпилептогенезе. Уровень серотонина в крови увеличивается после генерализованных судорог, что позволяет предположить усиление его синтеза энтерохромаффинными клетками кишечника [80]. Предполагается, что циркулирующий в крови серотонин может попадать в мозг лишь в ограниченном количестве [81], однако во время интенсивных приступов, таких как эпилептический статус, проницаемость гематоэнцефалического барьера увеличивается [82], потенциально облегчая обмен серотонина между периферическим кровообращением и центральной нервной системой. Вовлеченность мозгового серотонина в регуляцию эпилептических процессов в ЦНС показана во многих исследованиях (обзор — [42]).

Кишечные пептиды. Помимо доминирующих энтерохромаффинных клеток в диффузной энтерокриной системе обнаружено множество других клеток, обладающих секреторной активностью. В контексте рассматриваемой проблемы наибольший интерес представляют некоторые пептиды, обладающие нейротропным, в том числе противосудорожным или нейропротекторным действием. Так, К-клетки кишечника секретируют глюкозозависимый инсулиноотропный полипептид (GIP), стимулирующий выделение инсулина в ответ на рецепцию жиров и углеводов. Рецепторы этого пептида обнаружены в головном мозге [83] и в том числе в гиппокампе, где их активация усиливает пролиферацию прогениторных клеток субгранулярного слоя зубчатой извилины [84]. Повышение экспрессии рецепторов GIP отмечается на разных стадиях литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии [85], а их агонисты показали нейропротекторный эффект в данной модели [86]. Вместе с тем отмечено, что уровень этого пептида в плазме крови растет после внутрижелудочного введения мышам SCFA [87].

I-клетки тонкого кишечника выделяют в кровь холецистокинин (ССК), пептидный гормон, стимулирующий выделение желчи и панкреатического сока, а также вызывающий чувство сытости. При этом нужно отметить, что как рецепторы к холецистокинину, так и сами холецистокинин-положительные интернейроны обнаружены в мозге, в

том числе, в гиппокампе [88]. Этот факт существенно затрудняет оценку вклада этого гормона в реализацию кишечно-мозговых взаимодействий. Тем не менее уменьшение плотности ССК-иммунореактивных волокон наблюдается в зубчатой извилине в модели височной эпилепсии [89]. Отмечено, что у GF-мышей концентрация ССК в кишечнике снижена [90].

Пептид нейротензин, секретируемый N-клетками тонкого кишечника, также имеет центральный пул. Аналоги нейротензина обладают антиконвульсантным действием [91]. L-клетки толстого кишечника выделяют еще два пептидных гормона — глюконоподобный пептид-1 (GLP-1) и пептид YY (PYY). В отдельных исследованиях установлено, что данные пептиды обладают выраженным влиянием на мозг и могут играть существенную роль в патогенезе эпилепсии. В частности, пептид YY является естественным лигандом рецепторов нейропептида Y (Y1R и Y2R). Активация этих рецепторов оказывает противосудорожный и нейропротекторный эффект в экспериментальных моделях эпилепсии [92], а нарушение экспрессии Y1R и Y2R в мозге отмечается у пациентов с фокальной кортикальной дисплазией — распространенной причиной фармакорезистентной эпилепсии [93]. В свою очередь, активация центральных рецепторов GLP-1 усиливает долговременную потенцию в гиппокампе, стимулирует нейрогенез и оказывает нейропротекторное действие [94]. Отмечено, что у GLP-1R-нокаутных мышей развиваются более тяжелые судороги и нейрональные повреждения после введения конвульсанта каината [95]. Уровень экспрессии GLP-1 коррелирует с изменениями состава кишечной микробиоты. Применение пробиотика *Lactobacillus reuteri* усиливает секрецию GLP-1 у здоровых людей после введения глюкозы [96]. Использование галактоолигосахаридов увеличивает секрецию GLP-1 и PYY [97].

Степень проникновения обсуждаемых пептидов через гематоэнцефалический барьер остается малоизученной. Тем не менее показано, что при наличии центральных рецепторов GIP мРНК самого пептида в мозге не обнаружено [83]. Вероятно, проникновение через гематоэнцефалический барьер происходит в циркумвентрикулярных областях. Это предположение доказано, в частности, для GLP-1 [98] и для нейротензина [99]. Кроме того, для многих нейротропных кишечных пептидов показано опосредованная реализация их влияния на структуры мозга через активацию собственных рецепторов на афферентных волокнах вагуса [100, 101].

Увеличение синтеза и высвобождение GLP-1 и PYY может происходить под действием, SCFA, выделяемых микробиотой [103–104].

Регуляция активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Выраженность припадков у животных в различных моделях эпилепсии также

существенно зависит от уровня гормонов стресса [105, 106]. При этом стресс-реактивность связана с составом микробиоты (обзор — [107]). GF-мыши показывают повышенную стресс-реактивность (увеличение уровня кортикостерона и АКТГ) в условиях иммобилизации, заражение их *Bifidobacterium infantis* нивелирует эти нарушения [30]. У чувствительных к стрессу GF-крыс линии F344 в условиях умеренного стресса (при помещении в новое пространство) также отмечается более выраженное увеличение уровня кортикостерона в крови, изменения экспрессии генов кортикотропин-рилизинг-фактора в гипоталамусе и глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе [108].

Пре- и пробиотики могут влиять на уровень стероидных гормонов и их динамику при стрессе. У людей пребиотики галактоолигосахариды снижали уровень кортизола в слюне, измеренный сразу после пробуждения [109]. Схожие результаты были получены у испытуемых, принимавших комбинированный препарат пробиотиков из *Lactobacillus helveticus* R0052 и *Bifidobacterium longum* R0175, при измерении кортизола в моче [110]. Еще одно исследование было проведено с использованием бактерии *Bifidobacterium longum* 1714, которая рассматривается как психобиотик, т.е. пробиотик, способный влиять на поведение и когнитивные функции. В ситуации стресса (испытуемые опускали руки в ледяную воду) люди, принимавшие данный препарат в течение четырех недель, показали меньшее увеличение кортизола в слюне по сравнению с нелечеными испытуемыми [111]. В эксперименте, проведенном на мышах, введение *Bifidobacterium breve* CCFM1025 в течение 5 нед уменьшало изменения, вызванные непредсказуемым стрессом: поведенческие нарушения, увеличение уровня кортикостерона и TNF α в крови, уровня IL-1 β в гиппокампе, изменения продукции кортикотропин-рилизинг-фактора в гипоталамусе и экспрессии генов глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе [112]. Было показано также, что стресс-индуцированное увеличение уровня кортикостерона может быть ослаблено введением SCFA [113]. При этом нужно отметить, что связь между гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой и кишечной микробиотой носит двунаправленный характер, поскольку стресс в свою очередь влияет на состояние и видовой состав микробиоты, что было выявлено у взрослых животных [114, 115] и у потомства стрессированных самок [116].

4) Прямое влияние микробных метаболитов на нейроны мозга

Еще одним путем взаимодействия кишечной микробиоты с мозгом является прямое влияние микробных метаболитов на нейроны мозга. К таким соединениям можно отнести, в частности, короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA—ацетат,

пропионат, бутират и др. [117]), которые производятся микробиотой в толстом кишечнике при ферментации пищевых волокон, причем микроорганизмы различаются по способности продуцировать SCFA, а состав микробиоты зависит от диеты [118, 119]. SCFA могут непосредственно действовать на нейроны, что было показано на культуре клеток, выделенных из узлового ганглия вагуса [120]. Также возможно прямое, не опосредованное вегетативной нервной системой, действие SCFA на клетки ЦНС, поскольку, попав в кровь, они могут в ограниченном количестве проникать в мозг, влияя на активность центральных нейронов [121]. SCFA являются лигандами рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPARs) [122], о которых речь пойдет ниже.

III. РЕЦЕПТОРЫ, АКТИВИРУЕМЫЕ ПРОЛИФЕРАТОРОМ ПЕРОКСИСОМ, И ИХ ЛИГАНДЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МОЗГЕ

Как уже было сказано выше, важную роль в кишечно-мозговых взаимодействиях и механизмах нейропротекторного действия модификации кишечной микробиоты могут играть SCFA, которые являются естественными лигандами рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPARs). PPARs — это ядерные транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию целого ряда генов, участвующих в обмене углеводов и липидов, в развитии воспалительных реакций и других процессах, включая клеточную дифференцировку и апоптоз [123–125].

Семейство PPARs включает три типа рецепторов: PPAR α , PPAR β/δ и PPAR γ [126], которые отличаются друг от друга по распределению в тканях, некоторой специфичности лигандов и физиологических функций [127]. Экспрессия PPARs выявлена в различных клетках организма, включая кишечник и мозг. В клетках нервной системы она обнаружена у разных биологических видов: крыс [128], мышей и человека [129]. PPARs обнаружены в нейронах [130–133], олигодендроцитах [133, 134], микроглии [135] и астроцитах [136, 137]. При этом отмечается региональная специфичность экспрессии PPAR α , PPAR γ и PPAR β/δ в мозге [128]. В частности, экспрессия PPAR γ повышена в таких областях, как кора, обонятельный бугорок, ядра таламуса и ретикулярная формация [128].

PPARs представляют большой интерес как один из основных интерфейсов взаимодействия кишечной микробиоты и центральных регуляторных систем организма (рис. 1).

Прежде всего, важно отметить высокую степень экспрессии рецепторов как в кишечнике, так и в головном мозге [127]. Кроме того, как было сказано вы-

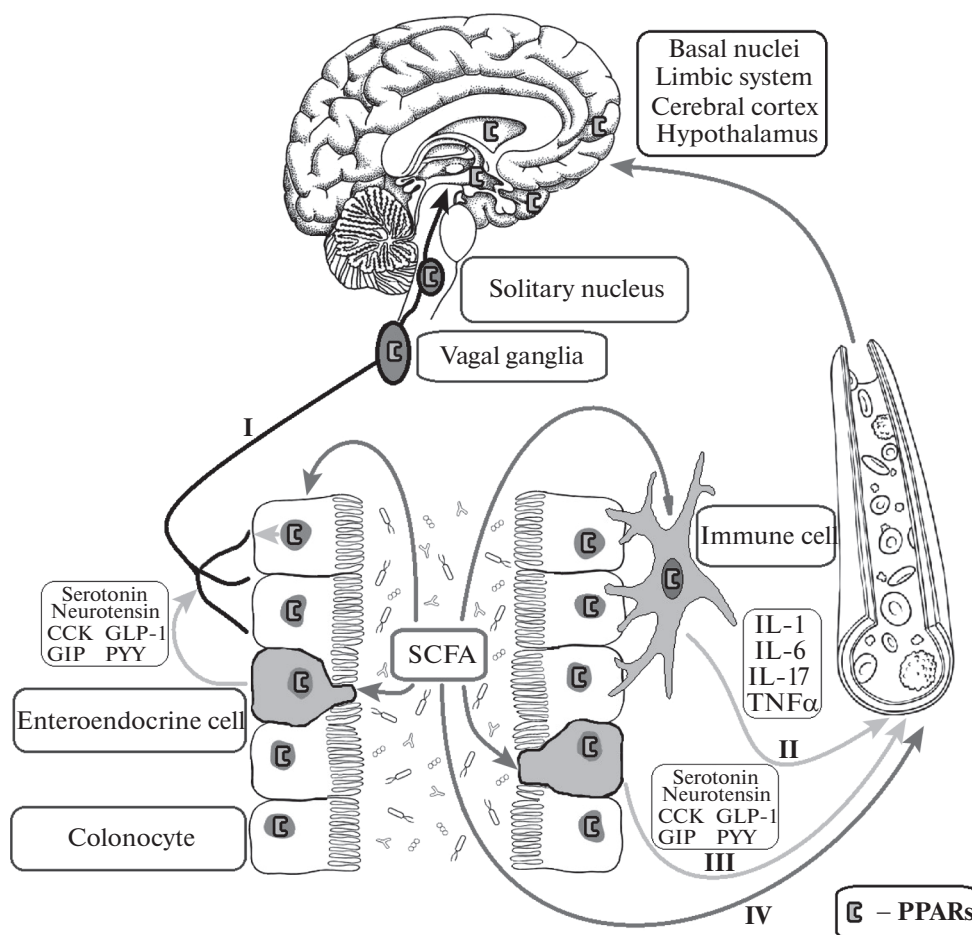


Рис. 1. Схема основных путей оси кишечник–мозг в условиях эпилептогенеза и роль PPARs в них. I – нервно-проводниковый путь; II – иммунный путь; III – нейроэндокринный путь; IV – прямой метаболитный путь; SCFA – короткоцепочечные жирные кислоты; CCK – холецистокинин; GLP-1 – глюкагоноподобный пептид-1; GIP – глюкозозависимый инсулиноотропный полипептид; PYY – пептид YY; IL-1 – интерлейкин 1; IL-6 – интерлейкин 6; IL-17 – интерлейкин 17; TNF α – фактор некроза опухоли α ; PPARs – рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором.

ше [123], PPARs могут быть активированы SCFA микробиоты кишечника, причем как в кишечнике, так и в головном мозге. PPARs также могут играть существенную роль в организации нервно-проводникового пути кишечного-мозговых взаимодействий на всех уровнях: окончаний афферентных волокон в кишечнике, периферических ганглиев вагуса, ядра солитарного тракта и его проекций в различных областях мозга. Так, активация в кишечнике PPAR α эндогенным агонистом олеоилэтаноламином приводит к изменениям в уровне экспрессии рецепторов дофамина в стриатуме только в условиях интактного вагуса [138], что указывает на вовлеченность PPAR α в регуляцию активности афферентных волокон блуждающего нерва. Доказано, что экспрессия PPAR γ в нижнем ганглии вагуса связана с характером питания [139]. Показано также, что стимуляция блуждающего нерва после моделирования ишемического инсульта у крыс увеличивает экспрессию PPAR γ в перифокальных областях коры [140]. Эти данные указывают на то, что

микробиота за счет активации PPARs может модулировать активность афферентов блуждающего нерва, что, учитывая доказанную эффективность VNS-терапии, может сказываться на эпилептогенезе. Вместе с тем PPARs могут регулировать синтез кишечных пептидов, предположительно вовлеченных в патогенез эпилепсии, поскольку показано, что увеличение синтеза и высвобождение GLP-1 и PYY может происходить под действием SCFA, выделяемых микробиотой [103–104]. Выявлено также, что выделение GLP-1 в кишечнике стимулируется агонистами PPAR β/δ [141]. Наконец, наличие экспрессии PPAR γ в гипоталамусе, гипофизе и надпочечниках и ее увеличение в модели иммунного стресса (ЛПС-индуцированной лихорадки) [142] указывают на возможную вовлеченность PPARs в стресс-модулирующие эффекты микробиоты кишечника, в том числе, при эпилепсии.

Большой интерес представляет тот факт, что активация PPARs приводит к подавлению воспалительных процессов [143] — важного патофизиологического механизма эпилепсии [144]. Свидетельство того, что PPARs играют роль в воспалении, было продемонстрировано на мышцах, нокаутных по гену PPAR α . Макрофаги этих мышечей демонстрируют повышенный ответ на действие провоспалительных стимулов [145]. Лиганд-индуцированная активация PPAR α и PPAR γ ингибирует продукцию многих медиаторов воспаления (провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, TNF- α и других) в иммунных и иных клетках организма [146], включая микроглию [147] и астроциты [148]. Эти эффекты могут быть опосредованы через ингибирование экспрессии провоспалительных генов, в частности, NF- κ B и AP-1 [149]. С другой стороны, активация PPAR α приводит к усилению экспрессии гена противовоспалительного цитокина — естественного антагониста рецепторов IL-1 (IL-1ra) [150], способного ослаблять развитие судорог и сопутствующих нарушений поведения при эпилепсии [71].

Еще одним возможным механизмом участия PPARs в эпилептогенезе может быть их вероятное влияние на уровень глутамата в синаптической щели: было показано, что PPAR γ усиливает продукцию астроглиального транспортера глутамата GLT-1 (EAAT2) [151], необходимого для удаления глутамата из синаптической щели.

Нейропротекторное действие агонистов PPAR γ было показано в модели острых судорог, индуцированных пентилентетразолом [147] и в хронической литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии [153–155]. В частности, было выявлено, что использование агониста PPAR γ росиглитазона в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии предотвращает когнитивный дефицит, активацию астроцитов и развитие спонтанных рецидивирующих судорог [153, 154], снижает воспалительную реакцию микроглии [155, 156], уменьшает оксидативный стресс [155], ингибирует воспалительные реакции в гиппокампе [155] и подавляет NMDA-опосредованные эпилептиформные разряды [157]. Также показано, что фенофибрат и безафибрат, агонисты PPAR α , проявляют противосудорожные свойства в пентилентетразоловой и литий-пилокарпиновой моделях [158, 159].

Эти данные позволяют рассматривать агонисты PPAR как перспективные препараты для лечения фармакорезистентной эпилепсии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на активно проводимые исследования, значительная часть больных эпилепсией страдает фармакорезистентными формами заболевания. Опубликованные данные указывают на возможную вовлеченность кишечного-мозговых взаимодей-

ствий в модуляцию эпилептогенеза. Появляются данные о нейропротекторных свойствах конкретных про- и пребиотиков в регуляции эпилептических процессов. Систематизируются данные о путях и механизмах, опосредующих влияние кишечной микробиоты на мозг. В рамках данной проблемы одним из наиболее перспективных направлений является исследование свойств лигандов рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом. Благодаря своим противовоспалительным и нейропротекторным свойствам PPARs могут быть потенциальными терапевтическими мишенями для лечения эпилепсии [160], а их экспрессия в органах и тканях указывает на возможную вовлеченность в реализацию кишечного-мозговых взаимодействий, в том числе, в условиях эпилептогенеза.

При этом ряд актуальных вопросов в этом направлении остается нерешенным. В частности, основные экспериментальные исследования в моделях эпилепсии выполнены с применением агонистов PPAR α и PPAR γ , но действие агонистов PPAR β/δ на процессы эпилептогенеза остается малоизученным. В литературе практически отсутствуют данные о динамике экспрессии генов PPAR α , PPAR γ и PPAR β/δ в клетках нервной системы в ходе эпилептогенеза. Аналогично, накоплено недостаточно данных об экспрессии PPARs в толстом кишечнике и периферической нервной системе при применении их агонистов, модификации кишечной микробиоты, а также в условиях эпилептогенеза.

Понимание данных вопросов необходимо для разработки эффективных схем терапии эпилепсии и судорожных состояний, в связи с чем они должны быть разрешены в ходе дальнейших исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Поддержано РФФИ, грант № 20-515-00020 и БРФФИ, грант № M20P-328.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

О.Е. Зубарева — подготовка текста обзора, Т.Б. Мелик-Касумов — идея работы, участие в подготовке текста обзора (разделы II-1, II-3), рисунок, резюме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sander J.W. (2003) The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol*. 16: 165–170. <https://doi.org/10.1097/01.wco.0000063766.15877.8e>
2. Mayer E.A., Knight R., Mazmanian S.K., Cryan J.F., Tillich K. (2014) Gut Microbes and the Brain: Paradigm

- Shift in Neuroscience. *J Neurosci* 34: 15490–15496. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3299-14.2014>
3. Jena A., Montoya C.A., Mullaney J.A., Dilger R.N., Young W., McNabb W.C., Roy N.C. (2020) Gut-Brain Axis in the Early Postnatal Years of Life: A Developmental Perspective. *Front Integr Neurosci* 14:44. <https://doi.org/10.3389/fnint.2020.00044>
 4. Moysidou C.M., Owens R.M. (2021) Advances in modeling the human microbiome–gut–brain axis in vitro. *Biochem Soc Transact* 49 (1):187–201. <https://doi.org/10.1042/BST20200338>
 5. Shaikh M.F., Lee C.Y., Chen W.N., Shaikh F.A. (2020) The Gut-Brain-Axis on the Manifestation of Depressive Symptoms in Epilepsy: An Evidence-Driven Hypothesis. *Front Pharmacol* 11: 465. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00465>
 6. Iannone L.F., Preda A., Blotti re H.M., Clarke G., Albani D., Belcastro V., Carotenuto M., Cattaneo A., Citraro R., Ferraris C., Ronchi F., Luongo G., Santocchi E., Guiducci L., Baldelli P., Iannetti P., Pedersen S., Petretto A., Provasi S., Selmer K., Spalice A., Tagliabue A., Verrotti A., Segata N., Zimmermann J., Minetti C., Mainardi P., Giordano C., Siodiya S., Zara F., Russo E., Striano P. (2019) Microbiota-gut brain axis involvement in neuropsychiatric disorders. *Expert Rev Neurother* 19: 1037–1050. <https://doi.org/10.1080/14737175.2019.1638763>
 7. De Caro C., Iannone L.F., Citraro R., Striano P., De Sarro G., Constanti A., Cryan J.F., Russo E. (2019) Can we ‘seize’ the gut microbiota to treat epilepsy? *Neurosci Biobehav Rev* 107: 750–764. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.002>
 8. Jiang C., Li G., Huang P., Liu Z., Zhao B. (2017) The Gut Microbiota and Alzheimer’s Disease. *J Alzheimer’s Dis* 58: 750–764. <https://doi.org/10.3233/JAD-161141>
 9. Cattaneo A., Cattane N., Galluzzi S., Provasi S., Lopizzo N., Festari C., Ferrari C., Guerra U.P., Paghera B., Muscio C., Bianchetti A., Volta G.D., Turla M., Cotelli M.S., Gennuso M., Prella A., Zanetti O., Lussignoli G., Mirabile D., Bellandi D., Gentile S., Belotti G., Villani D., Harach T., Bolmont T., Padovani A., Boccardi M., Frisoni G.B. (2017) Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiol Aging* 49: 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.019>
 10. Parashar A., Udayabanu M. (2017) Gut microbiota: Implications in Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 38. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.02.002>
 11. Forsyth C.B., Shannon K.M., Kordower J.H., Voigt R.M., Shaikh M., Jaglin J.A., Estes J.D., Dodiya H.B., Kesavarzian A. (2011) Increased Intestinal Permeability Correlates with Sigmoid Mucosa alpha-Synuclein Staining and Endotoxin Exposure Markers in Early Parkinson’s Disease. *PLoS One* 6: e28032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028032>
 12. Hilton D., Stephens M., Kirk L., Edwards P., Potter R., Zajicek J., Broughton E., Hagan H., Carroll C. (2014) Accumulation of α -synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson’s disease. *Acta Neuropathol* 127: 235–41. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1214-6>
 13. Mangiola F. (2016) Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol* 22. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.361>
 14. Liang S., Wu X., Hu X., Wang T., Jin F. (2018) Recognizing Depression from the Microbiota–Gut–Brain Axis. *Int J Mol Sci* 19: 1592. <https://doi.org/10.3390/ijms19061592>
 15. Chu F., Shi M., Lang Y., Shen D., Jin T., Zhu J., Cui L. (2018) Gut Microbiota in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Current Applications and Future Perspectives. *Mediators Inflamm* 2018:8168717. <https://doi.org/10.1155/2018/8168717>
 16. Dahlin M., Prast-Nielsen S. (2019) The gut microbiome and epilepsy. *EBioMedicine* 44: 741–746. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.024>
 17. Chen C.-H., Lin C.-L., Kao C.-H. (2015) Irritable Bowel Syndrome Increases the Risk of Epilepsy. *Medicine (Baltimore)* 94: e1497. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001497>
 18. Pittayanon R., Lau J.T., Yuan Y., Leontiadis G.I., Tse F., Surette M., Moayyedi P. (2019) Gut Microbiota in Patients With Irritable Bowel Syndrome—A Systematic Review. *Gastroenterology* 157: 97–108. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.03.049>
 19. Peng A., Qiu X., Lai W., Li W., Zhang L., Zhu X., He S., Duan J., Chen L. (2018) Altered composition of the gut microbiome in patients with drug-resistant epilepsy. *Epilepsy Res* 147: 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2018.09.013>
 20. Xie G., Zhou Q., Qiu C.-Z., Dai W.-K., Wang H.-P., Li Y.-H., Liao J.-X., Lu X.-G., Lin S.-F., Ye J.-H., Ma Z.-Y., Wang W.-J. (2017) Ketogenic diet poses a significant effect on imbalanced gut microbiota in infants with refractory epilepsy. *World J Gastroenterol* 23: 6164–6171. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i33.6164>
 21. G mez-Egu l az M., Ramón-Tr pero J.L., Pérez-Martínez L., Blanco J.R. (2018) The beneficial effect of probiotics as a supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: a pilot study. *Benef Microbes* 9: 875–881. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0018>
 22. Paoli A., Mancin L., Bianco A., Thomas E., Mota J.F., Piccini F. (2019) Ketogenic Diet and Microbiota: Friends or Enemies? *Genes (Basel)* 10: 534. <https://doi.org/10.3390/genes10070534>
 23. Linefeed M., Eng A., Darban H., Bjerkner A., Zetterstr m C.K., Allander T., Andersson B., Borenstein E., Dahlin M., Prast-Nielsen S. (2019) The ketogenic diet influences taxonomic and functional composition of the gut microbiota in children with severe epilepsy. *Biofilms Microbiomes* 5: 5. <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0073-2>
 24. Shen W., Gaskins H.R., McIntosh M.K. (2014) Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes. *J Nutr Biochem* 25: 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.009>
 25. Olson C.A., Vuong H.E., Yano J.M., Liang Q.Y., Nusbaum D.J., Hsiao E.Y. (2018) The Gut Microbiota Mediates the Anti-Seizure Effects of the Ketogenic Diet. *Cell* 173: 1728–1741.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.027>

26. Eor J.Y., Tan P.L., Son Y.J., Kwak M.J., Kim S.H. (2021) Gut microbiota modulation by both *Lactobacillus* fermentum MSK 408 and ketogenic diet in a murine model of pentylenetetrazole-induced acute seizure. *Epilepsy Res* 169: 106506. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2020.106506>
27. Nishino R., Mikami K., Takahashi H., Tomonaga S., Furuse M., Hiramoto T., Aiba Y., Koga Y., Sudo N. (2013) Commensal microbiota modulate murine behaviors in a strictly contamination-free environment confirmed by culture-based methods. *Neurogastroenterol Motil* 25: 521–528. <https://doi.org/10.1111/nmo.12110>
28. Heijtz R.D., Wang S., Anuar F., Qian Y., Bjorkholm B., Samuelsson A., Hibberd M.L., Forssberg H., Pettersson S. (2011) Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 3047–3052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>
29. Sudo N., Chida Y., Aiba Y., Sonoda J., Oyama N., Yu X.-N., Kubo C., Koga Y. (2004) Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558: 263–275. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>
30. Konno R., Oowada T., Ozaki A., Iida T., Niwa A., Yasumura Y., Mizutani T. (1993) Origin of D-alanine present in urine of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase activity. *Am J Physiol Liver Physiol* 265: G699–G703. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1993.265.4.G699>
31. Kapur J. (2018) Role of NMDA receptors in the pathophysiology and treatment of status epilepticus. *Epilepsia Open* 3: 165–168. <https://doi.org/10.1002/epi4.12270>
32. Chapman A.G. (1998) Chapter 24 Glutamate receptors in epilepsy. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)60449-5](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)60449-5)
33. Cryan J.F., O'Riordan K.J., Cowan C.S.M., Sandhu K.V., Bastiaansen T.F.S., Boehme M., Codagnone M.G., Cusotto S., Fulling C., Golubeva A.V., Guzzetta K.E., Jaggar M., Long-Smith C.M., Lyte J.M., Martin J.A., Molinero-Perez A., Moloney G., Morelli E., Morillas E., O'Connor R., Cruz-Pereira J.S., Peterson V.L., Rea K., Ritz N.L., Sherwin E., Spichak S., Teichman E.M., van de Wouw M., Ventura-Silva A.P., Wallace-Fitzsimons S.E., Hyland N., Clarke G., Dinan T.G. (2019) The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev* 99: 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
34. Hoban A.E., Stilling R.M., Moloney G., Shanahan F., Dinan T.G., Clarke G., Cryan J.F. (2018) The microbiome regulates amygdala-dependent fear recall. *Mol Psychiatry* 23: 1134–1144. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.100>
35. Luczynski P., Whelan S.O., O'Sullivan C., Clarke G., Shanahan F., Dinan T.G., Cryan J.F. (2016) Adult microbiota-deficient mice have distinct dendritic morphological changes: differential effects in the amygdala and hippocampus. *Eur J Neurosci* 44: 2654–2666. <https://doi.org/10.1111/ejn.13291>
36. Collins J., Borojevic R., Verdu E.F., Huizinga J.D., Ratcliffe E.M. (2014) Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 26: 98–107. <https://doi.org/10.1111/nmo.12236>
37. Chinna Meyyappan A., Forth E., Wallace C.J.K., Milev R. (2020) Effect of fecal microbiota transplant on symptoms of psychiatric disorders: a systematic review. *BMC Psychiatry* 20: 299. <https://doi.org/10.1186/s12888-020-02654-5>
38. He Z., Cui B.-T., Zhang T., Li P., Long C.-Y., Ji G.-Z., Zhang F.-M. (2017) Fecal microbiota transplantation cured epilepsy in a case with Crohn's disease: The first report. *World J Gastroenterol* 23: 3565–3568. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i19.3565>
39. Bercik P., Denou E., Collins J., Jackson W., Lu J., Jury J., Deng Y., Blennerhassett P., Macri J., McCoy K.D., Verdu E.F., Collins S.M. (2011) The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Behavior in Mice. *Gastroenterology* 141: 599–609. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.052>
40. Iughetti L., Lucaccioni L., Fugetto F., Predieri B., Berardi A., Ferrari F. (2018) Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review. *Neuropeptides* 72: 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.09.005>
41. Desbonnet L., Garrett L., Clarke G., Kiely B., Cryan J.F., Dinan T.G. (2010) Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience* 170: 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.005>
42. Bagdy G., Kecskemeti V., Riba P., Jakus R. (2007) Serotonin and epilepsy. *J Neurochem* 100: 857–873. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04277.x>
43. During D. (1993) Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 341: 1607–1610. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90754-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90754-5)
44. Janik R., Thomason L.A.M., Stanis A.M., Forsythe P., Bienenstock J., Stanis G.J. (2016) Magnetic resonance spectroscopy reveals oral *Lactobacillus* promotion of increases in brain GABA, N-acetyl aspartate and glutamate. *Neuroimage* 125: 988–995. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.11.018>
45. Doelken M.T., Stefan H., Pauli E., Stadlbauer A., Struffert T., Engelhorn T., Richter G., Ganslandt O., Doerfler A., Hammen T. (2008) 1H-MRS profile in MRI positive- versus MRI negative patients with temporal lobe epilepsy. *Seizure* 17: 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2008.01.008>
46. Savignac H.M., Corona G., Mills H., Chen L., Spencer J.P.E., Tzortzis G., Burnet P.W.J. (2013) Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-D-aspartate receptor subunits and D-serine. *Neurochem Int* 63: 756–764. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.10.006>
47. Williams S., Chen L., Savignac H.M., Tzortzis G., Anthony D.C., Burnet P.W. (2016) Neonatal prebiotic (BGOS) supplementation increases the levels of synaptophysin, GluN2A-subunits and BDNF proteins in the adult rat hippocampus. *Synapse* 70: 121–124. <https://doi.org/10.1002/syn.21880>
48. Bravo J.A., Forsythe P., Chew M.V., Escaravage E., Savignac H.M., Dinan T.G., Bienenstock J., Cryan J.F. (2011) Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci* 108: 16050–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>

49. *Sperk G., Furtinger S., Schwarzer C., Pirker S.* (2004) GABA and Its Receptors in Epilepsy *Adv Exp Med Biol* 548: 92–103.
https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6376-8_7
50. *Jaglin M., Rhimi M., Philippe C., Pons N., Bruneau A., Goustard B., Daugé V., Maguin E., Naudon L., Rabot S.* (2018) Indole, a Signaling Molecule Produced by the Gut Microbiota, Negatively Impacts Emotional Behaviors in Rats. *Front Neurosci* 12: 216.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00216>
51. *Vazquez E., Barranco A., Ramirez M., Gruart A., Delgado-Garcia J.M., Jimenez M.L., Buck R., Rueda R.* (2016) 51. Dietary 2'-Fucosyllactose Enhances Operant Conditioning and Long-Term Potentiation via Gut-Brain Communication through the Vagus Nerve in Rodents. *PLoS One* 11: e0166070.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166070>
52. *Perez-Burgos A., Wang B., Mao Y.-K., Mistry B., Neufeld K.-A.M., Bienenstock J., Kunze W.* (2013) Psychoactive bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) elicits rapid frequency facilitation in vagal afferents. *Am J Physiol Liver Physiol* 304: G211–G220.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00128.2012>
53. *Sgritta M., Dooling S.W., Buffington S.A., Momin E.N., Francis M.B., Britton R.A., Costa-Mattioli M.* (2019) Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron* 101: 246–259.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.018>
54. *Lulic D., Ahmadian A., Baaj A.A., Benbadis S.R., Vale F.L.* (2009) Vagus nerve stimulation. *Neurosurg Focus* 27: E5.
<https://doi.org/10.3171/2009.6.FOCUS09126>
55. *Bonaz B., Picq C., Sinniger V., Mayol J.F., Clarençon D.* (2013) Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neurogastroenterol Motil* 25: 208–221.
<https://doi.org/10.1111/nmo.12076>
56. *Beekwilder J.P., Beems T.* (2010) Overview of the Clinical Applications of Vagus Nerve Stimulation. *J Clin Neurophysiol* 27: 130–138.
<https://doi.org/10.1097/WNP.0b013e3181d64d8a>
57. *Hornby P.J.* (2001) II. Excitatory amino acid receptors in the brain-gut axis. *Am J Physiol Liver Physiol* 280: G1055–G1060.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.6.G1055>
58. *De Vadder F., Grasset E., Mannerås Holm L., Karsenty G., Macpherson A.J., Olofsson L.E., Bäckhed F.* (2018) Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 6458–6463.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1720017115>
59. *Breit S., Kupferberg A., Rogler G., Hasler G.* (2018) Vagus Nerve as Modulator of the Brain–Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. *Front Psychiatry* 9: 44.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00044>
60. *Sarkar A., Lehto S.M., Harty S., Dinan T.G., Cryan J.F., Burnet P.W.J.* (2016) Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals. *Trends Neurosci* 39: 763–781.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.002>
61. *Wang S.-Z., Yu Y.-J., Adeli K.* (2020) Role of Gut Microbiota in Neuroendocrine Regulation of Carbohydrate and Lipid Metabolism via the Microbiota–Gut–Brain–Liver Axis. *Microorganisms* 8: 527.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8040527>
62. *Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L.* (2005) An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 122: 107–118.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>
63. *Ivanov I.I., Frutos R. de L., Manel N., Yoshinaga K., Rifkin D.B., Sartor R.B., Finlay B.B., Littman D.R.* (2008) Sp6fic Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. *Cell Host Microbe* 4: 337–349.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.009>
64. *Gaboriau-Routhiau V., Rakotobe S., Lécuyer E., Mulder I., Lan A., Bridonneau C., Rochet V., Pisi A., De Paep M., Brandi G., Eberl G., Snel J., Kelly D., Cerf-Bensussan N.* (2009) The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity* 31: 677–689.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.020>
65. *Furusawa Y., Obata Y., Fukuda S., Endo T.A., Nakato G., Takahashi D., Nakanishi Y., Uetake C., Kato K., Kato T., Takahashi M., Fukuda N.N., Murakami S., Miyauchi E., Hino S., Atarashi K., Onawa S., Fujimura Y., Lockett T., Clarke J.M., Topping D.L., Tomita M., Hori S., Ohara O., Morita T., Koseki H., Kikuchi J., Honda K., Hase K., Ohno H.* (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446–450.
<https://doi.org/10.1038/nature12721>
66. *Round J.L., Lee S.M., Li J., Tran G., Jabri B., Chatila T.A., Mazmanian S.K.* (2011) The Toll-Like Receptor 2 Pathway Establishes Colonization by a Commensal of the Human Microbiota. *Science* 332: 974–977.
<https://doi.org/10.1126/science.1206095>
67. *Lavelle E.C., Murphy C., O'Neill L.A.J., Creagh E.M.* (2010) The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol* 3: 17–28.
<https://doi.org/10.1038/mi.2009.124>
68. *Qin F., Wu H., Li X., Han J.* (2020) Correlation between changes in gut flora and serum inflammatory factors in children with noninfectious diarrhea. *J Int Med Res* 48: 300060519896154.
<https://doi.org/10.1177/0300060519896154>
69. *Li G., Bauer S., Nowak M., Norwood B., Tackenberg B., Rosenow F., Knake S., Oertel W.H., Hamer H.M.* (2011) Cytokines and epilepsy. *Seizure* 20: 249–256.
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.12.005>
70. *Vezzani A., Viviani B.* (2015) Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology* 96: 70–82.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.027>
71. *Dyomina A.V., Zubareva O.E., Smolensky I.V., Vasilev D.S., Zakharova M.V., Kovalenko A.A., Schwarz A.P., Ischenko A.M., Zaitsev A.V.* (2020) Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy. *Pharmaceuticals* 13: 340.
<https://doi.org/10.3390/ph13110340>
72. *Mazarati A.M., Pineda E., Shin D., Tio D., Taylor A.N., Sankar R.* (2010) Comorbidity between epilepsy and de-

- pression: Role of hippocampal interleukin-1 β . *Neurobiol Dis* 37: 461–467.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.001>
73. Yano J.M., Yu K., Donaldson G.P., Shastri G.G., Ann P., Ma L., Nagler C.R., Ismagilov R.F., Mazmanian S.K., Hsiao E.Y. (2015) Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell* 161: 264–276.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>
 74. Spohn S.N., Mawe G.M. (2017) Non-conventional features of peripheral serotonin signalling – the gut and beyond. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14: 412–420.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.51>
 75. Gershon M.D. (2013) 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 20: 14–21.
<https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32835bc703>
 76. León-Ponte M., Ahern G.P., O'Connell P.J. (2007) Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT₇ receptor. *Blood* 109: 3139–3146.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-052787>
 77. Jones L.A., Sun E.W., Martin A.M., Keating D.J. (2020) The ever-changing roles of serotonin. *Int J Biochem Cell Biol* 125: 105776.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105776>
 78. Reigstad C.S., Salmonson C.E., III J.F.R., Szurszewski J.H., Linden D.R., Sonnenburg J.L., Farrugia G., Kashyap P.C. (2015) Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB J* 29: 1395–1403.
<https://doi.org/10.1096/fj.14-259598>
 79. Wikoff W.R., Anfora A.T., Liu J., Schultz P.G., Lesley S.A., Peters E.C., Siuzdak G. (2009) Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3698–3703.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>
 80. Murugesan A., Rani M.R.S., Hampson J., Zonjy B., Lacuey N., Faingold C.L., Friedman D., Devinsky O., Sainju R.K., Schuele S., Diehl B., Nei M., Harper R.M., Bateman L.M., Richerson G., Lhatoo S.D. (2018) Serum serotonin levels in patients with epileptic seizures. *Epilepsia* 59: e91–e97.
<https://doi.org/10.1111/epi.14198>
 81. Young L.W., Darios E.S., Watts S.W. (2015) An immunohistochemical analysis of SERT in the blood–brain barrier of the male rat brain. *Histochem Cell Biol* 144: 321–329.
<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1343-1>
 82. Van Vliet E.A., Aronica E., Gorter J.A. (2015) Blood–brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. *Semin Cell Dev Biol* 38: 26–34.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.10.003>
 83. Usdin T.B., Mezey E., Button D.C., Brownstein M.J., Bonner T.I. (1993) Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133: 2861–2870.
<https://doi.org/10.1210/endo.133.6.8243312>
 84. Nyberg J. (2005) Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Is Expressed in Adult Hippocampus and Induces Progenitor Cell Proliferation. *J Neurosci* 25: 1816–1825.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4920-04.2005>
 85. Figueiredo C.P., Pamplona F.A., Mazzuco T.L., Aguiar A.S., Walz R., Prediger R.D.S. (2010) Role of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its receptor in the central nervous system: therapeutic potential in neurological diseases. *Behav Pharmacol* 21: 394–408.
<https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32833c8544>
 86. Tian M.-J., Wang R.-F., Hölscher C., Mi R.-L., Yuan Z.-Y., Li D.-F., Xue G.-F. (2019) The novel GLP-1/GIP dual receptor agonist DA3-CH is neuroprotective in the pilocarpine-induced epileptogenesis rat model. *Epilepsy Res* 154: 97–106.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.05.008>
 87. Lin H.V., Frassetto A., Kowalik Jr. E.J., Nawrocki A.R., Lu M.M., Kosinski J.R., Hubert J.A., Szeto D., Yao X., Forrest G., Marsh D.J. (2012) Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLoS One* 7: e35240.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035240>
 88. Fasano C., Rocchetti J., Pietrajtis K., Zander J.-F., Manseau F., Sakae D.Y., Marcus-Sells M., Ramet L., Morel L.J., Carrel D., Dumas S., Bolte S., Bernard V., Vigneault E., Goutagny R., Ahnert-Hilger G., Giros B., Dumas S., Williams S., El Mestikawy S. (2017) Regulation of the Hippocampal Network by VGLUT3-Positive CCK-GABAergic Basket Cells. *Front Cell Neurosci* 11: 11: 140.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00140>
 89. Sun C., Sun J., Erisir A., Kapur J. (2014) Loss of cholecystokinin-containing terminals in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 62: 44–55.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.08.018>
 90. Woods S.E., Leonard M.R., Hayden J.A., Brophy M.B., Bernert K.R., Lavoie B., Muthupalani S., Whary M.T., Mawe G.M., Nolan E.M., Carey M.C., Fox J.G. (2015) Impaired cholecystokinin-induced gallbladder emptying incriminated in spontaneous “black” pigment gallstone formation in germfree Swiss Webster mice. *Am J Physiol Liver Physiol* 308: G335–G349.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00314.2014>
 91. Lee H.-K., Zhang L., Smith M.D., White H.S., Bulaj G. (2009) Glycosylated Neurotensin Analogues Exhibit Sub-picomolar Anticonvulsant Potency in a Pharmacoresistant Model of Epilepsy. *ChemMedChem* 4: 400–405.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.200800421>
 92. Corvino V., Marchese E., Giannetti S., Lattanzi W., Bonvissuto D., Biamonte F., Mongiovì A.M., Michetti F., Geloso M.C. (2012) The neuroprotective and neurogenic effects of neuropeptide Y administration in an animal model of hippocampal neurodegeneration and temporal lobe epilepsy induced by trimethyltin. *J Neurochem* 122: 415–426.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07770.x>
 93. Li L., Deng J., Liu C., Luo H., Guan Y., Zhou J., Qi X., Li T., Xu Z.D., Luan G.-M. (2016) Altered expression of neuropeptide Y receptors caused by focal cortical dysplasia in human intractable epilepsy. *Oncotarget* 7: 15329–15338.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7855>
 94. Salcedo I., Tweedie D., Li Y., Greig N.H. (2012) Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: an emerging opportunity to treat neurodegen-

- erative and cerebrovascular disorders. *Br J Pharmacol* 166: 1586–1599.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01971.x>
95. *During M.J., Cao L., Zuzga D.S., Francis J.S., Fitzsimons H.L., Jiao X., Bland R.J., Klugmann M., Banks W.A., Drucker D.J., Haile C.N.* (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* 9: 1173–1179.
<https://doi.org/10.1038/nm919>
 96. *Simon M.-C., Strassburger K., Nowotny B., Kolb H., Nowotny P., Burkart V., Zivehe F., Hwang J.-H., Stehle P., Pacini G., Hartmann B., Holst J.J., MacKenzie C., Bindels L.B., Martinez I., Walter J., Henrich B., Schloot N.C., Roden M.* (2015) Intake of *Lactobacillus reuteri* Improves Incretin and Insulin Secretion in Glucose-Tolerant Humans: A Proof of Concept. *Diabetes Care* 38: 1827–1834.
<https://doi.org/10.2337/dc14-2690>
 97. *Overduin J., Schoterman M.H.C., Calame W., Schonewille A.J., Ten Bruggencate S.J.M.* (2013) Dietary galacto-oligosaccharides and calcium: effects on energy intake, fat-pad weight and satiety-related, gastrointestinal hormones in rats. *Br J Nutr* 109: 1338–1348.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512003066>
 98. *Kastin A.J., Akerstrom V., Pan W.* (2002) Interactions of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) with the Blood-Brain Barrier. *J Mol Neurosci* 18: 7–14.
<https://doi.org/10.1385/JMN:18: 1-2:07>
 99. *Banks W.A., Wustrow D.J., Cody W.L., Duff Davis M., Kastin A.J.* (1995) Permeability of the blood-brain barrier to the neurotensin8–13 analog NT1. *Brain Res* 695: 59–63.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00836-F](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00836-F)
 100. *Krieger J.-P., Langhans W., Lee S.J.* (2015) Vagal mediation of GLP-1's effects on food intake and glycemia. *Physiol Behav* 152: 372–380.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.001>
 101. *Koda S., Date Y., Murakami N., Shimbara T., Hanada T., Toshinai K., Nijima A., Furuya M., Inomata N., Osuye K., Nakazato M.* (2005) The Role of the Vagal Nerve in Peripheral PYY3–36-Induced Feeding Reduction in Rats. *Endocrinology* 146: 2369–2375.
<https://doi.org/10.1210/en.2004-1266>
 102. *Samuel B.S., Shaito A., Motoike T., Rey F.E., Backhed F., Manchester J.K., Hammer R.E., Williams S.C., Crowley J., Yanagisawa M., Gordon J.I.* (2008) Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16767–16772.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808567105>
 103. *Bindels L.B., Dewulf E.M., Delzenne N.M.* (2013) GPR43/FFA2: physiopathological relevance and therapeutic prospects. *Trends Pharmacol Sci* 34: 226–232.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.02.002>
 104. *Larraufie P., Martin-Gallaisiaux C., Lapaque N., Dore J., Gribble F.M., Reimann F., Blottiere H.M.* (2018) SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells. *Sci Rep* 8: 74.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18259-0>
 105. *Taher T.R., Salzberg M., Morris M.J., Rees S., O'Brien T.J.* (2005) Chronic Low-Dose Corticosterone Supplementation Enhances Acquired Epileptogenesis in the Rat Amygdala Kindling Model of TLE. *Neuropsychopharmacology* 30: 1610–1616.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300709>
 106. *Karst H., Bosma A., Hendriksen E., Kamphuis W., de Kloet E.R., Joëls M.* (1997) Effect of Adrenalectomy in Kindled Rats. *Neuroendocrinology* 66: 348–359.
<https://doi.org/10.1159/000127258>
 107. *De Weerth C.* (2017) Do bacteria shape our development? Crosstalk between intestinal microbiota and HPA axis. *Neurosci Biobehav Rev* 83: 458–471.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.09.016>
 108. *Crumeyrolle-Arias M., Jaglin M., Bruneau A., Vancassel S., Cardona A., Dugé V., Naudon L., Rabot S.* (2014) Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 42: 207–217.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.014>
 109. *Schmidt K., Cowen P.J., Harmer C.J., Tzortzis G., Errington S., Burnet P.W.J.* (2015) Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 232: 1793–1801.
<https://doi.org/10.1007/s00213-014-3810-0>
 110. *Messaoudi M., Lalonde R., Violle N., Javelot H., Desor D., Nejdí A., Bisson J.-F., Rougeot C., Pichelin M., Cazaubiel M., Cazaubiel J.-M.* (2011) Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr* 105: 755–764.
<https://doi.org/10.1017/S0007114510004319>
 111. *Allen A.P., Hutch W., Borre Y.E., Kennedy P.J., Temko A., Boylan G., Murphy E., Cryan J.F., Dinan T.G., Clarke G.* (2016) *Bifidobacterium longum* 1714 as a translational psychobiotic: modulation of stress, electrophysiology and neurocognition in healthy volunteers. *Transl Psychiatry* 6: e939.
<https://doi.org/10.1038/tp.2016.191>
 112. *Tian P., O'Riordan K.J., Lee Y., Wang G., Zhao J., Zhang H., Cryan J.F., Chen W.* (2020) Towards a psychobiotic therapy for depression: *Bifidobacterium breve* CCFM1025 reverses chronic stress-induced depressive symptoms and gut microbial abnormalities in mice. *Neurobiol Stress* 12: 100216.
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100216>
 113. *Van de Wouw M., Boehme M., Lyte J.M., Wiley N., Strain C., O'Sullivan O., Clarke G., Stanton C., Dinan T.G., Cryan J.F.* (2018) Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations. *J. Physiol.* 596: 4923–4944.
<https://doi.org/10.1113/JP276431>
 114. *Bailey M.T., Dowd S.E., Galley J.D., Hufnagle A.R., Allen R.G., Lyte M.* (2011) Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* 25: 397–407.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.023>
 115. *Bailey M.T., Dowd S.E., Parry N.M.A., Galley J.D., Schauer D.B., Lyte M.* (2010) Stressor Exposure Disrupts Commensal Microbial Populations in the Intestines and Leads to Increased Colonization by *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* 78: 1509–1519.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00862-09>
 116. *Golubeva A.V., Crampton S., Desbonnet L., Edge D., O'Sullivan O., Lomasney K.W., Zhdanov A.V., Crispie F., Moloney R.D., Borre Y.E., Cotter P.D., Hyland N.P., O'Halloran K.D., Dinan T.G., O'Keefe G.W., Cryan J.F.*

- (2015) Prenatal stress-induced alterations in major physiological systems correlate with gut microbiota composition in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 60: 58–74.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.06.002>
117. Russo R., Cristiano C., Avagliano C., De Caro C., La Rana G., Raso G.M., Canani R.B., Meli R., Calignano A. (2018) Gut-brain Axis: Role of Lipids in the Regulation of Inflammation, Pain and CNS Diseases. *Curr Med Chem* 25: 3930–3952.
<https://doi.org/10.2174/0929867324666170216113756>
 118. Holmes E., Li J.V., Marchesi J.R., Nicholson J.K. (2012) Gut Microbiota Composition and Activity in Relation to Host Metabolic Phenotype and Disease Risk. *Cell Metab* 16: 559–564.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.007>
 119. Morrison D.J., Preston T. (2016) Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7: 189–200.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
 120. Goswami C., Iwasaki Y., Yada T. (2018) Short-chain fatty acids suppress food intake by activating vagal afferent neurons. *J Nutr Biochem* 57: 130–135.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.009>
 121. Frost G., Sleeth M.L., Sahuri-Arisoylu M., Lizarbe B., Cerdan S., Brody L., Anastasovska J., Ghourab S., Hankir M., Zhang S., Carling D., Swann J.R., Gibson G., Viardot A., Morrison D., Louise Thomas E., Bell J.D. (2014) The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun* 5: 3611.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4611>
 122. Oh H.Y.P., Visvalingam V., Wahli W. (2019) The PPAR–microbiota–metabolic organ trilogy to fine-tune physiology. *FASEB J* 33: 9706–9730.
<https://doi.org/10.1096/fj.201802681RR>
 123. Zolezzi J.M., Santos M.J., Bastías-Candia S., Pinto C., Godoy J.A., Inestrosa N.C. (2017) PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation. *Biol Rev* 92: 2046–2069.
<https://doi.org/10.1111/brev.12320>
 124. Hong F., Pan S., Guo Y., Xu P., Zhai Y. (2019) PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules* 24: 2545.
<https://doi.org/10.3390/molecules24142545>
 125. Cullingford T.E. (2004) The ketogenic diet; fatty acids, fatty acid-activated receptors and neurological disorders. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* 70: 253–264.
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2003.09.008>
 126. Berger J., Moller D.E. (2002) The Mechanisms of Action of PPARs. *Annu Rev Med* 53: 409–435.
<https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104018>
 127. Grygiel-Górniak B. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. *Nutr J* 13: 17.
<https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>
 128. Moreno S., Farioli-Vecchioli S., Cerù M. (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid x receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123: 131–145.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.064>
 129. Warden A., Truitt J., Merriman M., Ponomareva O., Jameson K., Ferguson L.B., Mayfield R.D., Harris R.A. (2016) Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain. *Sci Rep* 6: 27618.
<https://doi.org/10.1038/srep27618>
 130. Xing G.Q., Zhang L.X., Zhang L., Heynen T., Yoshikawa T., Smith M., Weiss S., Deterawadleigh S. (1995) Rat PPAR δ Contains a CGG Triplet Repeat and Is Prominently Expressed in the Thalamic Nuclei. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 1015–1025.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2871>
 131. Braissant O., Foulfelle F., Scotto C., Dauça M., Wahli W. (1996) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354–366.
<https://doi.org/10.1210/endo.137.1.8536636>
 132. Krémarič-Bouillaud P., Schohn H., Dauça M. (2000) Regional distribution of PPAR β in the cerebellum of the rat. *J Chem Neuroanat* 19: 225–232.
[https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(00\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(00)00065-X)
 133. Woods J.W., Tanen M., Figueroa D.J., Biswas C., Zycband E., Moller D.E., Austin C.P., Berger J.P. (2003) Localization of PPAR δ in murine central nervous system: expression in oligodendrocytes and neurons. *Brain Res* 975: 10–21.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02515-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02515-0)
 134. Granneman J., Skoff R., Yang X. (1998) Member of the peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 51: 563–573.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980301\)51:5<563::AID-JNR3>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980301)51:5<563::AID-JNR3>3.0.CO;2-D)
 135. Bernardo A., Ajmone-Cat M.A., Levi G., Minghetti L. (2003) 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 regulates the functional state and the survival of microglial cells through multiple molecular mechanisms. *J Neurochem* 87: 742–751.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02045.x>
 136. Cristiano L., Bernardo A., Cerù M.P. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. *J Neurocytol* 30: 671–683.
<https://doi.org/10.1023/A:1016525716209>
 137. Cullingford T.E., Bhakoo K., Peuchen S., Dolphin C.T., Patel R., Clark J.B. (2002) Distribution of mRNAs Encoding the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α , β , and γ and the Retinoid X Receptor α , β , and γ in Rat Central Nervous System. *J Neurochem* 70: 1366–375.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70041366.x>
 138. Hankir M.K., Seyfried F., Hintschich C.A., Diep T.-A., Kleberg K., Kranz M., Deuther-Conrad W., Tellez L.A., Rullmann M., Patt M., Teichert J., Hesse S., Sabri O., Brust P., Hansen H.S., de Araujo I.E., Krügel U., Fenske W.K. (2017) Gastric Bypass Surgery Recruits a Gut PPAR- α -Striatal D1R Pathway to Reduce Fat Appetite in Obese Rats. *Cell Metab* 25: 335–344.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.006>
 139. Liu C., Bookout A.L., Lee S., Sun K., Jia L., Lee C., Udit S., Deng Y., Scherer P.E., Mangelsdorf D.J., Gautron L., Elmquist J.K. (2014) PPAR γ in Vagal Neurons Regulates

- High-Fat Diet Induced Thermogenesis. *Cell Metab* 19: 722–730.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.021>
140. Ying Jiang Y., Li L., Liu B., Zhang Y., Chen Q., Chang-qing Li C. (2015) PPAR γ Upregulation Induced by Vagus Nerve Stimulation Exerts Anti-Inflammatory Effect in Cerebral Ischemia/Reperfusion Rats. *Med Sci Monit* 21: 268–275.
<https://doi.org/10.12659/MSM.891407>
 141. Daoudi M., Hennuyer N., Borland M.G., Touche V., Duhem C., Gross B., Caiazzo R., Kerr–Conte J., Pattou F., Peters J.M., Staels B., Lestavel S. (2011) PPAR β/δ Activation Induces Enteroendocrine L Cell GLP-1 Production. *Gastroenterology* 140: 1564–1574.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.045>
 142. Liu Y.L., Shi J.X., Lu J., Che Z.Q., Zhu H.L., Hou Y.Q., Yin Y.L., Zhao S.J., Ding B.Y., Liu H.M. (2010) Up-regulated expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis of weaned pigs after *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge. *Vet J* 184: 230–235.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.02.010>
 143. Villapol S. (2018) Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation. *Cell Mol Neurobiol* 38: 121–132.
<https://doi.org/10.1007/s10571-017-0554-5>
 144. Rana A., Musto A.E. (2018) The role of inflammation in the development of epilepsy. *J Neuroinflammat* 15: 144.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1192-7>
 145. Crisafulli C., Cuzzocrea S. (2009) The role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α) in the regulation of inflammation in macrophages. *Shock* 32: 62–73.
<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31818bbad6>
 146. Ricote M., Glass C. (2007) PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Biol Lipids* 1771: 926–935.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.02.013>
 147. Xu J., Storer P.D., Chavis J.A., Racke M.K., Drew P.D. (2005) Agonists for the peroxisome proliferator-activated receptor- α and the retinoid X receptor inhibit inflammatory responses of microglia. *J Neurosci Res* 81: 403–411.
<https://doi.org/10.1002/jnr.20518>
 148. Xu J., Chavis J.A., Racke M.K., Drew P.D. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor- α and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of astrocytes. *J Neuroimmunol* 176: 95–105.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.04.019>
 149. Daynes R.A., Jones D.C. (2002) Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2: 748–759.
<https://doi.org/10.1038/nri912>
 150. Stienstra R., Mandard S., Tan N.S., Wahli W., Trautwein C., Richardson T.A., Lichtenauer–Kaligis E., Kersten S., Müller M. (2007) The Interleukin-1 receptor antagonist is a direct target gene of PPAR α in liver. *J Hepatol* 46: 869–877.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.11.019>
 151. Zhao C., Jiang M., Zhang L., Hu Y., Hu Z., Zhang M., Qi J., Su A., Lou N., Xian X., Zhang J., Li W., Zhang M. (2019) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma participates in the acquisition of brain ischemic tolerance induced by ischemic preconditioning via glial glutamate transporter 1 *in vivo* and *in vitro*. *J Neurochem* 151: 608–625.
<https://doi.org/10.1111/jnc.14824>
 152. Adabi Mohazab R., Javadi-Paydar M., Delfan B., Dehpour A.R. (2012) Possible involvement of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway in the anticonvulsant effect of acute pioglitazone on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. *Epilepsy Res* 101: 28–35.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2012.02.015>
 153. Hong S., Xin Y., HaiQin W., GuiLian Z., Ru Z., ShuQin Z., HuQing W., Li Y., Ning B., YongNan L. (2013) The PPAR γ agonist rosiglitazone prevents neuronal loss and attenuates development of spontaneous recurrent seizures through BDNF/TrkB signaling following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurochem Int* 63: 405–412.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.07.010>
 154. Hong S., Xin Y., HaiQin W., GuiLian Z., Ru Z., ShuQin Z., HuQing W., Li Y., Yun D. (2012) The PPAR γ agonist rosiglitazone prevents cognitive impairment by inhibiting astrocyte activation and oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurol Sci* 33: 559–566.
<https://doi.org/10.1007/s10072-011-0774-2>
 155. Sun H., Huang Y., Yu X., Li Y., Yang J., Li R., Deng Y., Zhao G. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, rosiglitazone, suppresses CD40 expression and attenuates inflammatory responses after lithium pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Int J Dev Neurosci* 26: 505–515.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.01.009>
 156. Peng J., Wang K., Xiang W., Li Y., Hao Y., Guan Y. (2019) Rosiglitazone polarizes microglia and protects against pilocarpine-induced status epilepticus. *CNS Neurosci Ther* 25: 1363–1372.
<https://doi.org/10.1111/cns.13265>
 157. Wong S.-B., Cheng S.-J., Hung W.-C., Lee W.-T., Min M.-Y. (2015) Rosiglitazone Suppresses In Vitro Seizures in Hippocampal Slice by Inhibiting Presynaptic Glutamate Release in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *PLoS One* 10: e0144806.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144806>
 158. Saha L., Bhandari S., Bhatia A., Banerjee D., Chakrabarti A. (2014) Anti-kindling Effect of Bezafibrate, a Peroxisome Proliferator-activated Receptors Alpha Agonist, in Pentylenetetrazole Induced Kindling Seizure Model. *J Epilepsy Res* 4: 45–54.
<https://doi.org/10.14581/jer.14011>
 159. Porta N., Vallée L., Lecoite C., Bouchaert E., Staels B., Bordet R., Auvin S. (2009) Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist, exerts anti-convulsive properties. *Epilepsia* 50: 943–948.
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01901.x>
 160. Łukawski K., Gryta P., Łuszczki J., Czuczwar S.J. (2016) Exploring the latest avenues for antiepileptic drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov* 11: 369–382.
<https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1154840>

THE GUT-BRAIN AXIS AND PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS IN THE REGULATION OF EPILEPTOGENESIS

O. E. Zubareva^a and T. B. Melik-Kasumov^b

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

^b *Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

A large proportion of patients with epilepsy suffer from pharmacoresistant forms of the disease, and this makes the search for new treatments urgent. The possible role of gut-brain interactions in the pathogenesis of epilepsy is widely discussed. Recent experimental and clinical studies show a correlation between the balance of gut microbiota and the severity of epileptogenesis. Various methods to modify the microbiota composition demonstrate its significant impact on the clinical course of epilepsy. Nevertheless, the question remains open as to the basic receptor element of the gut-brain axis, a sort of an interface between the gut microorganisms and the body's regulatory systems.

This review aims to analyze the pathways and levels of gut microbiota involvement in the pathogenesis and pathogenesis of epilepsy. Among these pathways, the neural, metabolic, immune, and endocrine pathways are distinguished. Analysis of the data obtained to date shows a significant role for peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in these processes. The expression of these receptors in the main structures of the gut-brain axis, the presence of their ligands among the metabolites of microbiota, as well as anticonvulsant and/or neuroprotective activities described for some PPAR agonists, allow a hypothesis to be proposed on the role of PPARs as the above-mentioned signaling interface in the gut-brain axis. Separate attention is paid to the therapeutic potential of PPAR agonists in epilepsy treatment.

Keywords: epilepsy, PPARs, gut-brain axis, gut microbiota, vagus nerve, gut hormones

ВЛИЯНИЕ ОХЛАЖДЕНИЯ НА ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТА–СИЛА, ЭФФЕКТ ПОТЕНЦИАЦИИ ПАУЗОЙ И ЧАСТОТНО-ЗАВИСИМОЕ УСКОРЕНИЕ РЕЛАКСАЦИИ В МИОКАРДЕ МОРСКОЙ СВИНКИ

© 2021 г. А. С. Аверин^{1,*}, Н. М. Захарова¹, С. В. Тарлачков^{2,3}

¹ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН Пущино, Россия

³ Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

*e-mail: averin.icb@gmail.com

Поступила в редакцию 04.12.2020 г.

После доработки 25.02.2021 г.

Принята к публикации 19.03.2021 г.

Общеизвестно, что глубокая гипотермия приводит к нарушениям в работе сердца вплоть до полной остановки, в то же время гипотермия может предотвращать гипоксические повреждения. При этом значительная часть работ, посвященных глубокой гипотермии, проведена на крысах и мышах, миокард которых значительно отличается от человеческого. В данной работе мы исследовали влияние глубокой гипотермии на ритмоинотропные явления в миокарде морской свинки, который во многом схож с миокардом человека. Проведено исследование зависимости частота–сила, эффекта потенциации паузой и частотно-зависимого ускорения расслабления в диапазоне 0.1–3.0 Гц в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки, при температурах 30, 20 и 10°C. Показано, что при охлаждении до температуры 10°C включительно сохраняется положительная зависимость частота–сила, в формировании которой ведущую роль играет Ca^{2+} ток L-типа, что говорит о том, что данный механизм сохраняет свою функцию даже в условиях глубокой гипотермии. Эффект потенциации паузой сохраняется до 20°C включительно, при дальнейшем охлаждении потенция сменяется спадом. Данный факт может свидетельствовать о том, что при 10°C нарушается функционирование саркоплазматического ретикулума, что проявляется в инвертировании эффекта потенциации паузой. Эффект частотно-зависимого ускорения кинетики сокращения также сохраняется до 20°C включительно. Это может служить подтверждением того, что проявление данного эффекта в миокарде связано с работой саркоплазматического ретикулума. Таким образом, нами было обнаружено, что среди исследованных нами частотно-зависимых эффектов есть блокируемые глубокой гипотермией (эффект потенциации паузой и частотно-зависимое ускорение расслабления) и устойчивые к данному воздействию (зависимость, частота, сила), что может отражать различия в температурной чувствительности лежащих в их основе Ca^{2+} транспортирующих механизмов.

Ключевые слова: сердце, папиллярная мышца, сила сокращения, ритмоинотропные отношения, морская свинка

DOI: 10.31857/S0044452921040021

ВВЕДЕНИЕ

Частота сокращений сердца (ЧСС) является одним из важнейших показателей работы миокарда. Помимо этого, показано, что ЧСС является также важным внутренним регулятором, позволяющим адаптировать производительность сердца согласно потребностям организма. В миокарде большинства млекопитающих рост ЧСС ведет к увеличению силы сокращения (положительный инотропный эффект) [1].

Исключение составляет миокард крыс и мышей, для которых описан двухфазный тип зависимости частота–сила (ЧС) [2, 3]. Особый интерес представляет сердце зимоспящих, способное менять тип зависимости ЧС в различных физиологических состояниях [4–7], и патологический миокард, демонстрирующий отсутствие роста силы сокращения или ее снижение при увеличении частоты стимуляции [8, 9].

Также увеличение ЧСС ведет к ускорению кинетики сокращения (положительный лузитропный эффект) — так называемое частотно-зависимое ускорение релаксации, что позволяет поддерживать нормальную наполняемость желудочков в здоровом миокарде [9, 10].

Еще одним важным показателем работы миокарда является эффект потенциации паузой, который может служить не только качественным показателем содержания Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме (СР) [12], но и важным диагностическим признаком [13–15].

Все эти явления в миокарде могут меняться в различном сочетании при развитии патологии [10, 14, 16].

Широко известно кардио-, и нейропротективное влияние умеренной гипотермии как в экспериментальных моделях [17, 18], так и в клинической практике [19]. С другой стороны, более глубокое охлаждение ведет к нежелательным явлениям в миокарде, таким как перегрузка клеток кальцием, рост напряжения покоя, нарушение проводимости, фибрилляция желудочков и др. [20–23].

В качестве объекта исследования нами был выбран миокард морской свинки, который по своим ритмоинотропным характеристикам гораздо ближе к миокарду человека, чем миокард крысы или мыши [1]. Существующие исследования гипотермии миокарда морской свинки и животных, сходных по типу ритмоинотропных отношений, как правило, проводились при одной частоте стимуляции, при этом нижняя граница гипотермии была близка к 20°C [22, 24, 25]. В исследованиях, охватывающих более широкий частотный диапазон, напротив, весьма ограниченными были изменения температуры всего 7°C [26]. Также значительная часть исследований по данной тематике была проведена на крысах или мышах, миокард которых имеет значительные отличия по сравнению с миокардом человека [27, 28]. Таким образом, ритмоинотропные характеристики миокарда морской свинки в условиях глубокой гипотермии остаются малоисследованными.

Понимание отдельных механизмов устойчивости ткани миокарда к охлаждению и их взаимосвязь могут помочь в дальнейшем для минимизации негативных последствий гипотермии, в первую очередь снижения сократимости. Задачей данного исследования было изучить влияние глубокой гипотермии (10°C) на следующие частотно-зависимые явления в миокарде морской свинки: зависимость частота—сила, эффект потенциации паузой и частотно-зависимое ускорение релаксации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились (в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 1986, 86/609/ЕЕС) на папиллярных мышцах (ПМ) правого желудочка морских свинок. В экспериментах использовали морских свинок породы Агути ($n = 19$, самцы, возраст 4–6 недель, вес 200–250 г). Животных содержали в виварии ИБК РАН в стандартных условиях в соответствии с правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев): в проветриваемых помещениях, исключающих возникновение сквозняков, резких перепадов температур. Световой режим составлял 12 ч света и 12 ч темноты, режим кормления — *ad libitum*. Температуру воздуха поддерживали в пределах 18–21°C.

Всех морских свинок, отобранных в эксперимент, доставляли в экспериментальное помещение из вивария не менее чем за 1 ч до его начала. Животных предварительно наркотизировали диэтиловым эфиром (Diethylether). Выделенное сердце помещали в раствор Тироде (20°C) следующего состава (мМ): NaCl, 135; KCl, 4; MgCl_2 , 1; CaCl_2 , 1.8; NaHCO_3 , 13.2; NaH_2PO_4 , 1.8; глюкоза, 11; (pH 7.4). Раствор аэрировали газовой смесью: O_2 (95%) + CO_2 (5%). Выделение ПМ, стимуляцию и измерение амплитуды сокращения в изометрическом режиме проводили по ранее описанной методике [29] при температуре перфузирующего раствора $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Диаметр папиллярных мышц варьировал от 0.6 до 1.0 мм, а длина — от 1.0 до 3.0 мм. Для исследования их механической активности использовали автоматизированную установку на основе персонального компьютера и плат АЦП-ЦАП (L-Card 154 и L-Card E14–440). Механическую активность мышц регистрировали с помощью механотрона 6Х–2М. В начале каждого опыта препарат стимулировали прямоугольными импульсами (напряжение 5 В, длительность 5 мс, силой тока, в 2 раза превышающей пороговую) частотой 1 Гц в течение 1 ч для стабилизации силы сокращения.

Зависимость “частота—сила” в изометрическом режиме регистрировали в интервале частот стимуляции от 0.1 до 3.0 Гц. При построении зависимости ЧС величину силы сокращения для каждой из частот стимуляции в исследуемом диапазоне выражали в процентах по отношению к ее величине на частоте стимуляции 1 Гц при 30°C, принимаемой за 100% [5, 7].

Регистрация эффекта паузы. На фоне постоянной стимуляции с заданной частотой, при которой сила сокращения находится на стабильном уровне (базовое сокращение), вносится пауза в стимуляцию, что приводит к потенциации первого после паузы сокращения (тестового). Величину эффекта выражали в процентах по отношению к силе сокращения на базовой частоте стимуляции (3 Гц при

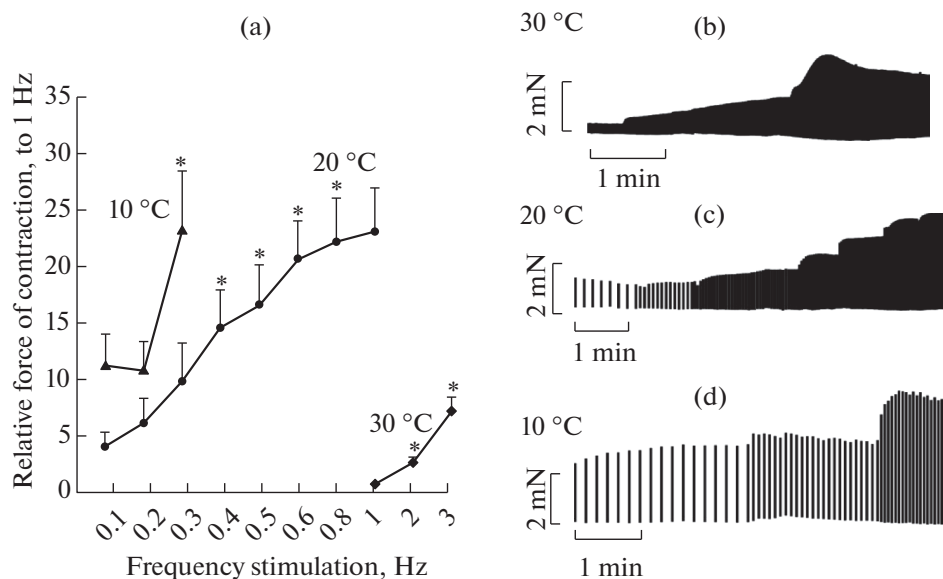


Рис. 1. Влияние температуры на зависимость частота–сила в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки ($n = 12$). Кривые зависимости силы сокращения от частоты стимуляции (а). По оси ординат: сила изометрического сокращения по отношению к частоте стимуляции на 1 Гц при 30°C, принимаемой за 1. По оси абсцисс: частота стимуляции, Гц. Данные представлены как средние значения $\pm$ ошибка среднего (* – достоверное отличие от начальной частоты для каждой температуры $p < 0.05$). Оригинальные записи сокращений при температуре 30(b), 20(c) и 10°C (d).

30°C и 0.3 Гц для 20 и 10°C). Данные проверяли на нормальность распределения при помощи теста Шапиро–Уилка. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью парного теста Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (one way ANOVA) (по уровню значимости $p < 0.05$). Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота–сила

При температуре 30°C в диапазоне 1–3 Гц наблюдался рост силы сокращения ПМ в 7.5 ± 1.3 раза относительно 1 Гц (рис 1а, 1b). Данный тип зависимости ЧС характерен для здорового миокарда большинства млекопитающих [1] и морских свинок, в частности [30]. При понижении температуры до 20°C происходит рост силы сокращения ПМ, как описано в литературе для миокарда морской свинки [24, 31] и для большого числа других животных: собак [32], кроликов и крыс [25]. С увеличением частоты стимуляции, начиная с 0.4 Гц сила сокращения ПМ увеличивается при переходе к каждой последующей частоте, в итоге увеличиваясь в 5.5 ± 1.1 раза от 0.1 к 1 Гц (рис. 1а, 1с). Помимо этого, как видно из рис. 1, при понижении температуры положительная ветвь зависимости ЧС сме-

щается влево, в область более низких частот, что сходно с результатами, полученными в условиях умеренной гипотермии на крысах [27], мышах [28] и кроликах [26]. При дальнейшем охлаждении до 10°C переход с 0.1 до 0.2 Гц не сопровождается ростом силы сокращения, и лишь при увеличении частоты стимуляции до 0.3 Гц происходит достоверное увеличение силы сокращения в 2.0 ± 0.5 раза от 0.1 к 0.3 Гц (рис. 1а, 1d). Следует отметить, что 5 из 12 ПМ утрачивали способность к сокращению при достижении 10°C (при этом увеличение порога не приводило к восстановлению сокращений). Предполагаем, что причиной подобной неоднородности могут быть индивидуальные особенности миокарда животных, для установления которых необходимы дальнейшие исследования по изучению корреляции между физиологическим ответом ткани на гипотермию и качественным и количественным составом основных белков участвующих в электромеханическом сопряжении в миокарде.

Сохранение положительной зависимости ЧС во всем исследованном диапазоне температур может свидетельствовать о сохранении значительной роли Ca^{2+} тока L-типа в активации сокращения [2]. Для подтверждения этого предположения были проведены опыты с использованием блокатора Ca^{2+} каналов L-типа нифедипином (2 мкМ). Как видно из рис. 2а и 2b при температуре 30°C нифедипин в значительной степени снижает силу сокращений на $77 \pm 11\%$ и $89 \pm 3\%$ при частоте стимуляции 1 и 3 Гц соответственно, на 20°C (рис. 2с, 2d)

это снижение составляет $91 \pm 2\%$ и $95 \pm 1\%$ при частоте стимуляции 0.1 и 0.3 Гц соответственно. Также предобработка нифедипином препятствует формированию положительной зависимости ЧС при обеих исследованных температурах. В целом полученные данные подтверждают предположение о том, что Ca^{2+} ток L-типа играет ведущую роль в формировании положительной зависимости ЧС при температурах 20 и 30°C. Следует отметить, что по нашим предварительным данным при достаточно низкой температуре такой, как 10°C, может быть существенно замедлено действие блокатора, при этом выход эффекта на плато может занять длительное время, что само может вносить погрешность в получаемые результаты. Также, согласно данным литературы, в таких условиях необходимо использовать значительно более высокие концентрации нифедипина, что может сказаться на селективности его воздействия [33]. Таким образом, необходимо более детальное исследование особенностей эффектов нифедипина на силу сокращения при 10°C и, возможно, поиск более подходящих подходов для блокирования Ca^{2+} тока L-типа.

Существуют два основных источника поступления внеклеточного Ca^{2+} в кардиомиоциты — Ca^{2+} ток L-типа и натрий-кальциевый обменник (NCX). Натрий-кальциевый обменник может напрямую поставлять Ca^{2+} в цитоплазму в обратном режиме, во время потенциала действия [34]. Такому функционированию NCX может способствовать повышенное накопление внутри клетки ионов Na^+ под воздействием гипотермии [35] и возрастающей частоты стимуляции [36]. Также NCX способен активировать сокращение миокарда при возобновлении электрической стимуляции в условиях блокирования Ca^{2+} тока L-типа и саркоплазматического ретикулума [37]. Помимо этого рост силы сокращения может происходить в результате того, что активность прямого режима NCX значительно падает [31], давая возможность закачать большее количество Ca^{2+} в СР. Положительный инотропный эффект угнетения прямого режима NCX сопровождается трансформацией зависимости ЧС из положительной в отрицательную [30]. Таким образом, NCX может вносить свой вклад в рост силы сокращения при охлаждении и увеличении частоты стимуляции, но не является основным механизмом, в противном случае это отразилось бы на зависимости ЧС.

Несмотря на то что Ca^{2+} ток L-типа играет ведущую роль в формировании положительной ветви ЧС [2] и роста силы сокращения в ответ на охлаждение [25, 38], ситуация с ним выглядит неоднозначной. В миокарде морской свинки были показаны как снижение Ca^{2+} тока с увеличением частоты стимуляции [39], так и его рост с последующим подавлением [40]. С понижением температуры ам-

плитуда Ca^{2+} тока в кардиомиоцитах кролика снижается, однако замедляется его инактивация и общее количество Ca^{2+} , вошедшего в клетку, остается на уровне, близком к исходному [41]. Для миокарда морской свинки также было показано снижение пиковых значений Ca^{2+} тока, которое, однако, не отменяло роста силы сокращения и выброса Ca^{2+} из СР, вызванного гипотермией [24, 42]. Полученные нами данные, с сохранением положительной зависимости ЧС и практически полное ее подавление блокатором Ca^{2+} каналов нифедипином (рис. 2) свидетельствуют в пользу того, что в миокарде морской свинки Ca^{2+} ток сохраняет свое ведущее значение в активации сокращения. Также следует отметить сохранение его частотно-зависимой регуляции, даже в условиях глубокой гипотермии, что проявляется в сохранении положительной зависимости ЧС при 10°C.

Потенциация паузой

При 30°C и частоте стимуляции 3 Гц мы регистрировали эффект потенциации паузой в диапазоне 0.6—1.8 с (рис. 3а, 3б). Начиная с 0.6 с эффект потенциации является достоверным и составляет $33 \pm 2\%$, достигая максимального значения в $60 \pm 5\%$ при 1.5 с, незначительно снижаясь при дальнейшем увеличении длительности паузы до 1.8 с ($58 \pm 5\%$). При 20°C эффект потенциации паузой регистрировали при существенно более низкой частоте стимуляции в 0.3 Гц (рис. 3с, 3д), это связано с тем, что при более высокой частоте в 1 Гц эффект паузы маскировался высоким базовым сокращением, и внесение паузы вызывало снижение тестового сокращения. При частотах выше 1 Гц, из-за более медленной кинетики сокращения, процесс релаксации не успевал произойти полностью, и могли наблюдаться нарушения в работе ПМ, такие как альтернация и рост диастолического напряжения. Достоверная потенциация наблюдалась при длительности паузы 10 с, составляя $28 \pm 7\%$. При дальнейшем увеличении паузы потенциация переходила в спад в $16 \pm 15\%$ при 60 с. Дальнейшее охлаждение до 10°C приводило к смене потенциации спадом в ответ на паузу, который увеличивался с ростом длительности, достигая $53 \pm 10\%$ относительно базового сокращения при длительности паузы 60 с (рис. 3е, 3ф).

Установлено, что эффект паузы является качественным показателем содержания Ca^{2+} в СР: увеличение амплитуды первого сокращения после паузы коррелирует с увеличением концентрации свободного кальция в цитоплазме, выбрасывающегося из СР при возобновлении стимуляции ПМ [12]. Сходно с данными других авторов, при снижении температуры потенциация паузой проявлялась при более длительных интервалах и меньшей частоте

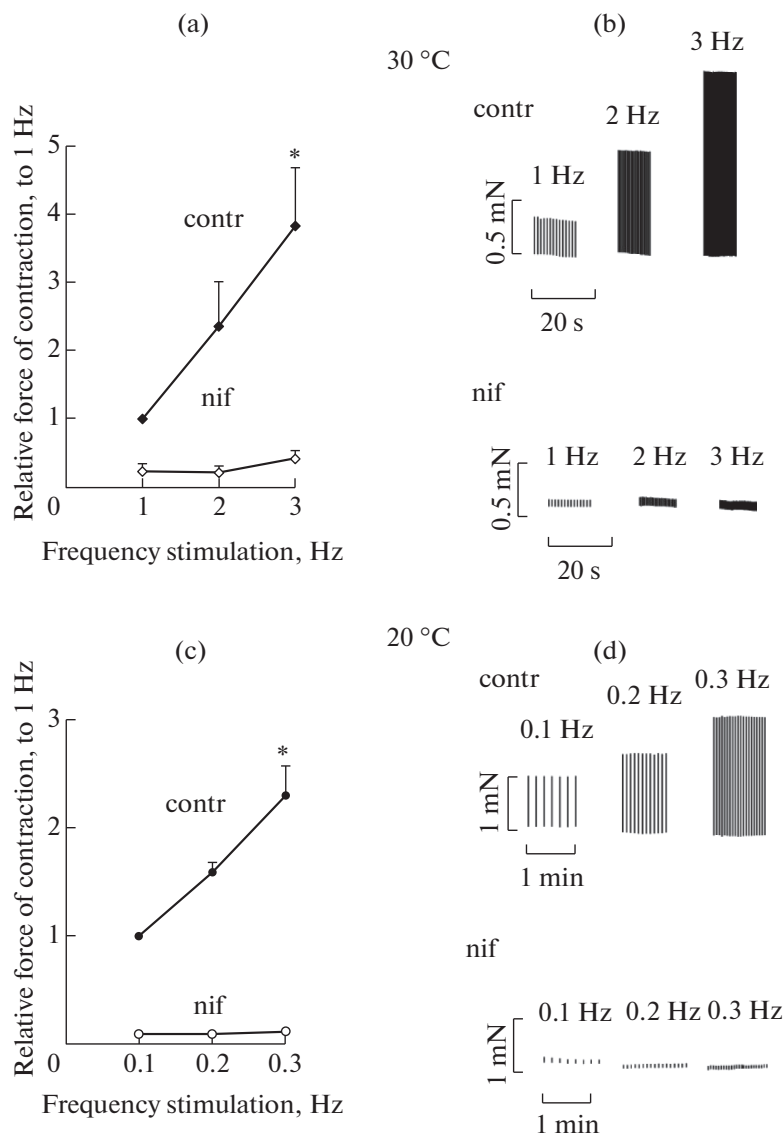


Рис. 2. Влияние нифедипина 2 мкМ на зависимость частота–сила в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки при 30°C, $n = 3$ (а, б) и 20°C, $n = 4$ (с, д). По оси ординат: сила изометрического сокращения по отношению к частоте стимуляции на 1 Гц при 30°C и 0.1 Гц при 20°C, принимаемой за 1. По оси абсцисс: частота стимуляции, Гц. Данные представлены как средние значения $\pm$ ошибка среднего (* – достоверное отличие от начальной частоты $p < 0.05$). Оригинальные записи сокращений при температуре 30°C (б), 20°C (д).

стимуляции [43]. В условиях умеренной гипотермии потенциация паузой в миокарде морской свинки увеличивается [43, 44], при этом крайне мало данных о влиянии глубокой гипотермии (около 10°C), и большая их часть касается гибернирующих животных, имеющих природные адаптации для поддержания нормальной функции миокарда в условиях низкой температуры. Тем не менее даже у этих животных наблюдается снижение эффекта потенциации паузой [4, 45]. Такое снижение может происходить как вследствие повышения утечки Ca^{2+} из СР [46], так и в результате снижения скорости его закачки [47]. В нашей работе впервые на

миокарде морской свинки продемонстрирована смена направления эффекта паузы с потенциации на подавление при температуре -10°C .

Частотно-зависимое ускорение релаксации

Как видно из рис. 4а и 4б, на 30°C увеличение частоты стимуляции с 1 до 3 Гц приводило к росту силы сокращения и ускорению его кинетических параметров. Так, время достижения максимума (ВДМ) ускорялось со 144 ± 7 до 110 ± 3 мс, а время полурасслабления (ВР50%) с 80 ± 7 до 55 ± 4 мс. При охлаждении до 20°C наблюдалась схожая кар-

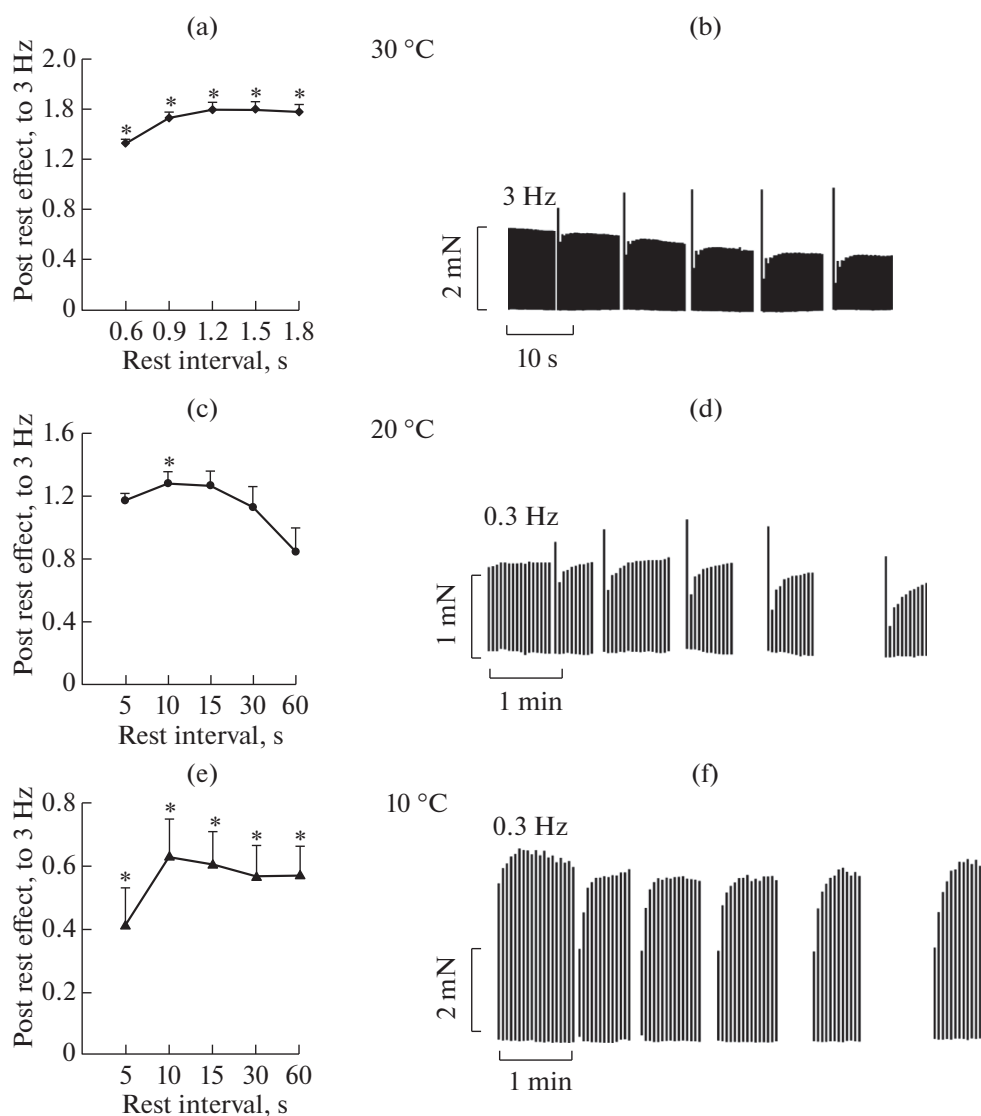


Рис. 3. Влияние температуры на эффект потенциации паузой в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки; при температуре 30(a) и 20(c), $n = 12$, и при 10°C, $n = 6$ (e). По оси ординат: сила первого после паузы сокращения в долях от единицы к силе стационарного сокращения на частоте стимуляции на 3 Гц при 30°C, 0.3 Гц 20°C и 0.3 Гц для 10°C, принимаемой за 100%. По оси абсцисс: длительность паузы, с. Данные представлены как средние значения $\pm$ ошибки среднего (* — достоверное отличие от силы базового сокращения $p < 0.05$). Оригинальные записи эффекта паузы при температуре 30(b), 20(d) и 10°C (f).

тина, при переходе с 0.1 до 1 Гц ВДМ ускорялось с 379 ± 11 до 265 ± 7 мс, а ВР50% с 256 ± 36 до 132 ± 11 мс (рис. 4с, 4d). При дальнейшем понижении температуры до 10°C, в ответ на увеличение частоты стимуляции с 0.1 до 0.3 Гц сила сокращения по-прежнему увеличивалась, однако ускорения временных параметров сокращения не происходило, напротив, намечается тенденция к их замедлению. Значение ВДМ составляло с 847 ± 35 до 924 ± 46 мс, а ВР50% с 642 ± 48 до 718 ± 45 мс (рис. 4е, 4f). Эти данные хорошо согласуются с общепризнанным фактом, что частотно-зависимое ускоре-

ние релаксации является неотъемлемым свойством здорового миокарда вне зависимости от собственного ему типа ритмоинотропии: двухфазного (мышь и крыса) или полностью положительного, характерного для большинства млекопитающих [48].

Ранее широко описывался факт того, что при физиологической или повышенной температуре эффект частотно-зависимого ускорения релаксации проявляется слабо, или отсутствует, в то время как умеренная гипотермия способствует более яркому проявлению данного эффекта [26, 27], однако

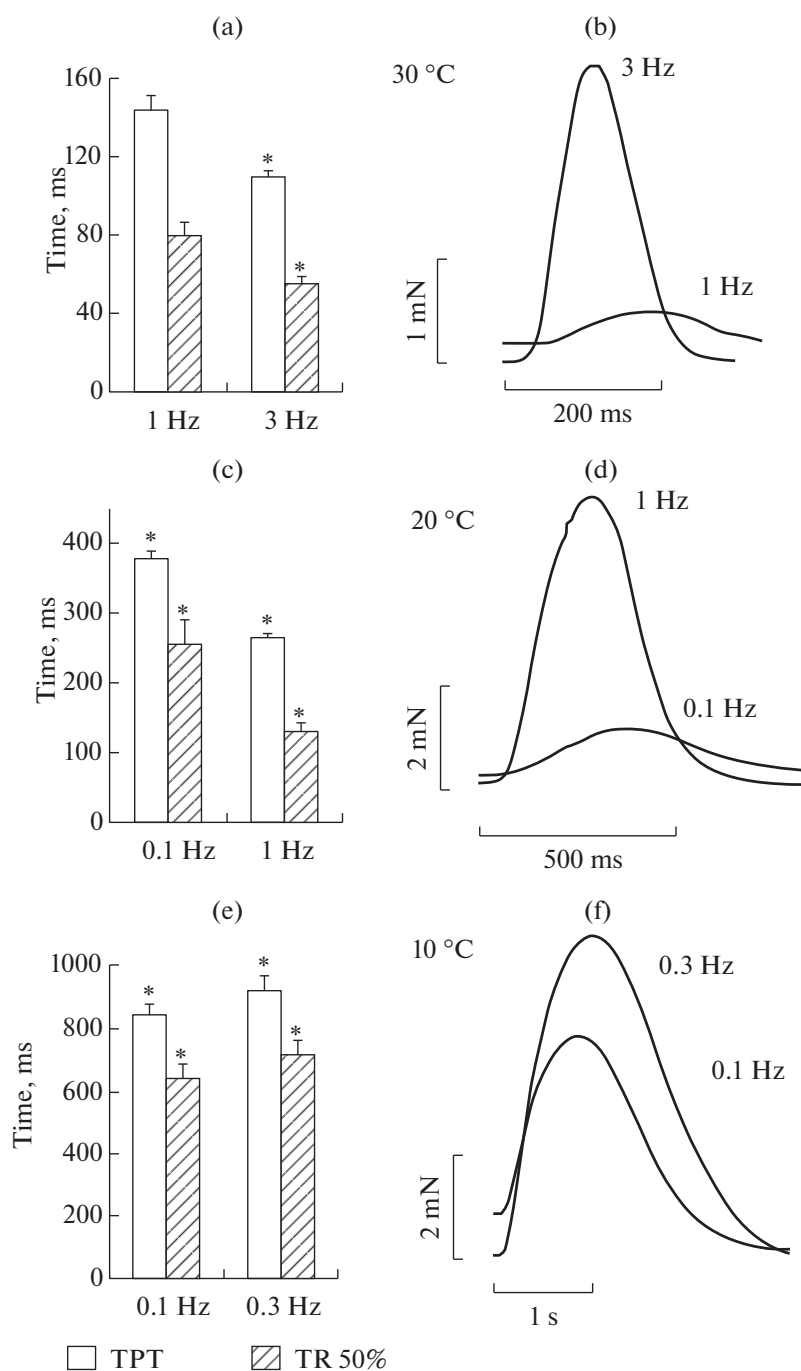


Рис. 4. Влияние температуры на частотно-зависимое ускорение кинетических параметров сокращения в папиллярных мышцах правого желудочка морской свинки ($n = 8$); ВДМ — время достижения максимума сокращения, ВР 50%—время расслабления до уровня 50% от максимума. По оси ординат: время в мс. По оси абсцисс: частота стимуляции, Гц. Данные представлены как средние значения $\pm$ ошибка среднего (* — достоверное отличие от 0.1 Гц $p < 0.05$). Оригинальные записи сокращений при температуре 30(б), 20(д) и 10(ф)°C.

сведения о его поведении в условиях глубокой гипотермии крайне ограничены. В условиях близких к физиологическим при температуре 37–30°C, в формировании частотно-зависимого ускорения релаксации может принимать участие как десенситизация миофиламентов [11], так и увеличение ак-

тивности Ca^{2+} АТФазы СР [49], хотя существуют работы, где показано, что главным ограничителем скорости расслабления при физиологических условиях является скорее кинетика взаимодействия миофиламентов с Ca^{2+} , нежели СР, и только с понижением температуры активность СР стано-

вится ключевым фактором [50]. В то же время необходимо учитывать возможность межвидовых различий, так, подавление СР в миокарде крысы приводило к полному блокированию частотно-зависимого ускорения релаксации [51], в то время как в миокарде морской свинки этого не происходило [52]. В полученных нами данных блокировка частотно-зависимого ускорения релаксации при глубокой гипотермии происходит одновременно с подавлением эффекта паузы, что может служить косвенным доказательством того, что для проявления частотно-зависимого ускорения кинетики необходим нормально функционирующий СР.

ВЫВОДЫ

Впервые было показано, что положительная зависимость ЧС в ПМ морской свинки сохраняется даже в условиях глубокой гипотермии до 10°C включительно, что может свидетельствовать о сохранении значительного вклада внеклеточных источников Ca^{2+} , в первую очередь Ca^{2+} тока L-типа, в активацию сокращения. Впервые показано, что при 10°C эффект внесения паузы на фоне постоянной стимуляции вместо потенциации вызывает спад силы первого сокращения после паузы, данный эффект можно трактовать как нарушение способности СР аккумулировать Ca^{2+} . Также было показано, что эффект частотно-зависимого ускорения релаксации демонстрирует большую температурную чувствительность и не регистрируется при 10°C, что может быть связано с нарушением функции СР, при этом конкретные механизмы, вызывающие дисфункцию СР, будь то утечка через RyR или снижение активности Ca^{2+} АТФазы СР, остаются неясными и могут служить дальнейшим объектом исследований.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.С. Аверин — планирование эксперимента, сбор данных, написание манускрипта; Н.М. Захарова — редактирование манускрипта; С.В. Тарлачков — обработка данных.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме ГЗ “Исследование особенностей и механизмов функционирования миокарда модельных животных в условиях гипотермии.”

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Endoh M. (2004) Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: Physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol* 500 (1–3): 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.013>
2. Stuyvers B., McCulloch A., Guo J., Duff H., ter Keurs H. (2002) Effect of stimulation rate, sarcomere length and Ca^{2+} on force generation by mouse cardiac muscle. *J Physiol* 544 (3): 817–830. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.024430>
3. Kassiri Z., Myers R., Kaprielian R., Banijamali H., Backx P. (2000) Rate-dependent changes of twitch force duration in rat cardiac trabeculae: A property of the contractile system. *J Physiol* 524 Pt 1: 221–231. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-3-00221.x>
4. Nakipova O., Zakharova N., Andreeva L., Chumaeva N., Averin A., Kosarskii L., Anufriev A., Lewinski D., Kockskamper J., Pieske B. (2007) The seasonal peculiarities of force-frequency relationships in active ground squirrel *Spermophilus undulatus* ventricle. *Cryobiology* 55 (3): 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.07.001>
5. Zakharova N., Nakipova O., Averin A., Tikhonov K., Solomonov N. (2009) Changes in force-frequency relationships in cardiac papillary muscles of hibernating ground squirrels under cooling. *Dokl Biol Sci* 424: 21–24. <https://doi.org/10.1134/s0012496609010074>
6. Kondo N., Shibata S. (1984) Calcium source for excitation-contraction coupling in myocardium of nonhibernating and hibernating chipmunks. *Science* 225 (4662): 641–643. <https://doi.org/10.1126/science.6740332>
7. Nakipova O., Averin A., Kosarsky L., Ignatiev D. (2019) The Force-Frequency Dependence in the Heart Papillary Muscle of Ground Squirrel as a Reflection of Changes in the Functional State of Animals during the Annual Cycle. *BIOPHYSICS* 64 (5): 786–792. <https://doi.org/10.1134/S0006350919050191>
8. Mulieri L., Hasenfuss G., Leavitt B., Allen P., Alpert N. (1992) Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 85 (5): 1743–1750. <https://doi.org/10.1161/01.cir.85.5.1743>
9. Silverman D., Rambod M., Lustgarten D., Lobel R., LeWinter M., Meyer M. (2020) Heart Rate-Induced Myocardial Ca^{2+} Retention and Left Ventricular Volume Loss in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc* 9 (17): e017215. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.017215>
10. Pieske B., Maier L., Bers D., Hasenfuss G. (1999) Ca^{2+} handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circulation research* 85 (1): 38–46. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.1.38>

11. *Lamberts R., Hamdani N., Soekhoe T., Boontje N., Zaremba R., Walker L., Tombe P., van der Velden J., Stienen G.* (2007) Frequency-dependent myofilament Ca^{2+} desensitization in failing rat myocardium. *J Physiol* 582 (Pt 2): 695–709.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.134486>
12. *Lukas A., Bose R.* (1986) Mechanisms of frequency-induced potentiation of contractions in isolated rat atria. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 334 (4): 480–487.
<https://doi.org/10.1007/BF00569390>
13. *Ahlberg S., Hamlen R., Ewert D., Iaizzo P., Mulligan L.* (2007) Novel means to monitor cardiac performance: The impact of the force-frequency and force-interval relationships on recirculation fraction and potentiation ratio. *Cardiovasc Eng* 7 (1): 32–38.
<https://doi.org/10.1007/s10558-007-9023-y>
14. *Schillinger W., Lehnart S., Prestle J., Preuss M., Pieske B., Maier L., Meyer M., Just H., Hasenfuss G.* (1998) Influence of SR Ca^{2+} -ATPase and Na^{+} - Ca^{2+} -exchanger on the force-frequency relation. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 1: 38–45.
<https://doi.org/10.1007/s003950050208>
15. *Kondratieva D., Afanasiev S., Usov V., Popov S.* (2017) Rhythmoinotropic Response of Papillary Muscles in Rats with Different Severity of Postinfarction Cardiosclerosis. *Bull Exp Biol Med* 163 (5): 612–616.
<https://doi.org/10.1007/s10517-017-3861-4>
16. *Kass D.* (1998) Force-frequency relation in patients with left ventricular hypertrophy and failure. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 1: 108–116.
<https://doi.org/10.1007/s003950050232>
17. *Tsai M.-S., Huang C.-H., Yu P.-H., Tsai C.-Y., Chen H.-W., Cheng H.-J., Chang W.-T., Wang T.-D., Chen W.-J.* (2015) Prolonged cooling duration mitigates myocardial and cerebral damage in cardiac arrest. *Am J Emerg Med* 33 (10): 1374–1381.
<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2015.07.030>
18. *Yu T., Yang Z., Li H., Ding Y., Huang Z., Li Y.* (2015) Short Duration Combined Mild Hypothermia Improves Resuscitation Outcomes in a Porcine Model of Prolonged Cardiac Arrest. *Biomed Res Int* 2015: 279192.
<https://doi.org/10.1155/2015/279192>
19. *Rittenberger J., Doshi A., Reynolds J.* (2015) Postcardiac Arrest Management. *Emerg Med Clin North Am* 33 (3): 691–712.
<https://doi.org/10.1016/j.emc.2015.04.011>
20. *Liu B., Wang L., Belke D.* (1991) Effect of low temperature on the cytosolic free Ca^{2+} in rat ventricular myocytes. *Cell calcium* 12 (1): 11–18.
[https://doi.org/10.1016/0143-4160\(91\)90080-x](https://doi.org/10.1016/0143-4160(91)90080-x)
21. *Wang, Wang S.-Q., Cao H.-M., Zhou Z.-Q.* (1997) Temperature dependence of the myocardial excitability of ground squirrel and rat. *Journal of Thermal Biology* 22 (3): 195–199.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(97\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(97)00010-7)
22. *Stowe D., Fujita S., An J., Paulsen R., Varadarajan S., Smart S.* (1999) Modulation of myocardial function and Ca^{2+} sensitivity by moderate hypothermia in guinea pig isolated hearts. *The American journal of physiology* 277 (6): H2321–H2332.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.6.H2321>
23. *Egorov Y., Glukhov A., Efimov I., Rosenshtraukh L.* (2012) Hypothermia-induced spatially discordant action potential duration alternans and arrhythmogenesis in nonhibernating versus hibernating mammals. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 303 (8): H1035–H1046.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00786.2011>
24. *Shutt R., Howlett S.* (2008) Hypothermia increases the gain of excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. *American journal of physiology. Cell physiology* 295(3):C692–700.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00287.2008>
25. *Shattock M., Bers D.* (1987) Inotropic response to hypothermia and the temperature-dependence of ryanodine action in isolated rabbit and rat ventricular muscle: Implications for excitation-contraction coupling. *Circulation research* 61 (6): 761–771.
<https://doi.org/10.1161/01.res.61.6.761>
26. *Mattheussen M., Mubagwa K., van Aken H., Wusten R., Boutros A., Flameng W.* (1996) Interaction of heart rate and hypothermia on global myocardial contraction of the isolated rabbit heart. *Anesthesia and analgesia* 82 (5): 975–981.
<https://doi.org/10.1097/00000539-199605000-00015>
27. *Hiranandani N., Varian K., Monasky M., Janssen P.* (2006) Frequency-dependent contractile response of isolated cardiac trabeculae under hypo-, normo-, and hyperthermic conditions. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 100 (5): 1727–1732.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01244.2005>
28. *Redel A., Baumgartner W., Golenhofen K., Drenckhahn D., Golenhofen N.* (2002) Mechanical activity and force-frequency relationship of isolated mouse papillary muscle: Effects of extracellular calcium concentration, temperature and contraction type. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 445 (2): 297–304.
<https://doi.org/10.1007/s00424-002-0931-9>
29. *Nakipova O., Averin A., Evdokimovskii E., Pimenov O., Kosarski L., Ignat'ev D., Anufriev A., Kokoz Y., Reyes S., Terzic A., Alekseev A.* (2017) Store-operated Ca^{2+} entry supports contractile function in hearts of hibernators. *PloS one* 12 (5): e0177469.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177469>
30. *Mubagwa K., Lin W., Sipido K., Bosteels S., Flameng W.* (1997) Monensin-induced reversal of positive force-frequency relationship in cardiac muscle: Role of intracellular sodium in rest-dependent potentiation of contraction. *J Mol Cell Cardiol* 29 (3): 977–989.
<https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.0342>

31. Mackiewicz U., Lewartowski B. (2006) Temperature dependent contribution of Ca²⁺ transporters to relaxation in cardiac myocytes: Important role of sarcolemmal Ca²⁺-ATPase. *J Physiol Pharmacol* 57 (1): 3–15.
32. Sprung J., Stowe D., Kampine J., Bosnjak Z. (1994) Hypothermia modifies anesthetic effect on contractile force and Ca²⁺ transients in cardiac Purkinje fibers. *The American journal of physiology* 267 (2 Pt 2): H725–33. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.2.H725>
33. Piper H., Hütter J., Spieckermann P. (1984) Temperature dependence of nifedipine action. *J Mol Cell Cardiol* 16 (3): 277–280. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(84\)80593-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(84)80593-3)
34. Bers D., Chen-Izu Y. (2015) Sodium and calcium regulation in cardiac myocytes: From molecules to heart failure and arrhythmia. *J Physiol* 593 (6): 1327–1329. <https://doi.org/10.1113/JP270133>
35. Isenberg G., Trautwein W. (1975) Temperature sensitivity of outward current in cardiac Purkinje fibers. Evidence of electrogenicity of active transport. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 358 (3): 225–234. <https://doi.org/10.1007/BF00587219>
36. Cohen C., Fozzard H., Sheu S. (1982) Increase in intracellular sodium ion activity during stimulation in mammalian cardiac muscle. *Circulation research* 50 (5): 651–662. <https://doi.org/10.1161/01.res.50.5.651>
37. Kuratomi S., Matsuoka S., Sarai N., Powell T., Noma A. (2003) Involvement of Ca²⁺ buffering and Na⁺/Ca²⁺ exchange in the positive staircase of contraction in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 446 (3): 347–355. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1023-1>
38. Wang S., Huang Y., Liu K., Zhou Z. (1997) Dependence of myocardial hypothermia tolerance on sources of activator calcium. *Cryobiology* 35 (3): 193–200. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2040>
39. Kaspar S., Pelzer D. (1995) Modulation by stimulation rate of basal and cAMP-elevated Ca²⁺ channel current in guinea pig ventricular cardiomyocytes. *J Gen Physiol* 106 (2): 175–201. <https://doi.org/10.1085/jgp.106.2.175>
40. Bates S., Gurney A. (1999) Use-dependent facilitation and depression of L-type Ca²⁺ current in guinea-pig ventricular myocytes: Modulation by Ca²⁺ and isoprenaline. *Cardiovasc Res* 44 (2): 381–389. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00216-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00216-3)
41. Puglisi J., Yuan W., Bassani J., Bers D. (1999) Ca(2+) influx through Ca(2+) channels in rabbit ventricular myocytes during action potential clamp: Influence of temperature. *Circulation research* 85 (6): e7–e16. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.6.e7>
42. Herve J., Yamaoka K., Twist V., Powell T., Ellory J., Wang L. (1992) Temperature dependence of electrophysiological properties of guinea pig and ground squirrel myocytes. *The American journal of physiology* 263 (1 Pt 2): R177–R184. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1992.263.1.R177>
43. Spencer C., Mörner S., Noble M., Seed W. (1994) Influences of stimulation frequency and temperature on interval-force relationships in guinea-pig papillary muscles. *Acta Physiol Scand* 150 (1): 11–20. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1994.tb09654.x>
44. Bjørnstad H., Tande P., Refsum H. (1993) Mechanisms for hypothermia-induced increase in contractile force studied by mechanical restitution and post-rest contractions in guinea-pig papillary muscle. *Acta Physiol Scand* 148 (3): 253–264. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1993.tb09556.x>
45. Zhou Z., Liu B., Dryden W., Wang L. (1991) Cardiac mechanical restitution in active and hibernating Richardson's ground squirrel. *The American journal of physiology* 260 (2 Pt 2): R353–R358. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.260.2.R353>
46. Moskvina A., Iaparov B., Ryvkin A., Solovyova O., Markhasin V. (2015) Electron-conformational transformations govern the temperature dependence of the cardiac ryanodine receptor gating. *Jetp Lett.* 102 (1): 62–68. <https://doi.org/10.1134/S002136401513010X>
47. Suko J. (1973) The effect of temperature on Ca²⁺ uptake and Ca²⁺-activated ATP hydrolysis by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Experientia* 29 (4): 396–398. <https://doi.org/10.1007/BF01926742>
48. Monasky M., Janssen P. (2009) The positive force-frequency relationship is maintained in absence of sarcoplasmic reticulum function in rabbit, but not in rat myocardium. *J Comp Physiol B* 179 (4): 469–479. <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0331-3>
49. Bluhm W., Kranias E., Dillmann W., Meyer M. (2000) Phospholamban: A major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 278 (1): H249–55. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.1.H249>
50. Janssen P., Stull L., Marbán E. (2002) Myofilament properties comprise the rate-limiting step for cardiac relaxation at body temperature in the rat. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 282 (2): H499–507. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00595.2001>
51. Valverde C., Mundiña-Weilenmann C., Said M., Ferrero P., Vittone L., Salas M., Palomeque J., Petroff M., Mattiazzi A. (2005) Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian heart: A property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation. *J Physiol* 562 (Pt 3): 801–813. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.075432>
52. Yard N., Chiesi M., Ball H. (1994) Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase, on the frequency-dependence of the contraction-relaxation cycle of the guinea-pig isolated atrium. *Br J Pharmacol* 113 (3): 1001–1007. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb17092.x>

EFFECT OF COOLING ON FORCE-FREQUENCY RELATIONSHIP, EFFECT OF REST POTENTIATION, AND FREQUENCY-DEPENDENT ACCELERATION OF RELAXATION IN THE GUINEA PIG MYOCARDIUM

A. S. Averin^a, N. M. Zakharova^a, and S. V. Tarlachkov^{b,c}

^a Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences, PSCBR RAS, Pushchino, Russia

^b G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms Russian Academy of Sciences, PSCBR RAS, Pushchino, Russia

^c M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

While deep hypothermia is well known to lead to cardiac malfunction up to circulatory arrest, moderate hypothermia can prevent hypoxic damage to the heart. Importantly, a large body of research on deep hypothermia was carried out on rats and mice whose myocardium is significantly different from the human. In the present work, we investigated the effect of deep hypothermia on rhythmoinotropic phenomena in the guinea pig (GP) whose myocardium is more alike the human. The force-frequency relationship, effect of rest potentiation, and frequency-dependent acceleration of relaxation were studied in GP right ventricular papillary muscles (PM) within a range of 0.1–3.0 Hz at temperatures of 30, 20 and 10°C. It was shown that a positive force-frequency dependence, mediated mainly by inward Ca^{2+} current through the L-type Ca^{2+} channel, persists when cooling to 10°C, suggesting that this mechanism retains its function even under deep hypothermia. The effect of rest (pause-induced) potentiation persists down to 20°C, while further cooling replaces potentiation by depression. This may indicate that at 10°C the functioning of the sarcoplasmic reticulum is impaired, as manifested in the pause-induced inversion of the potentiating effect. The effect of frequency-dependent acceleration of the kinetics of muscular contraction also persists down to 20°C, supporting the suggestion that this effect in the GP myocardium relies on the sarcoplasmic reticulum. Thus, we found that among the studied frequency-dependent effects, there are those affected by deep hypothermia (pause-induced potentiating effect, frequency-dependent acceleration of relaxation) and those resistant to this exposure (force-frequency dependence), which may reflect the differences in thermal sensitivity of the underlying mechanisms of Ca^{2+} transport.

Keywords: heart, papillary muscle, contractility, rhythmoinotropic relationships, guinea pig

ИНСУЛИН⁺-КЛЕТКИ И ОСНОВНЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ (Pdx1, MafA И Ngn3) В ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-ГО И 2-ГО ТИПА

© 2021 г. М. Байкенова^{1,2,*}, В. А. Черешнев^{1,2}, К. В. Соколова^{1,2}, И. Ф. Гетте^{1,2}, В. В. Емельянов², И. Г. Данилова^{1,2}

¹ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

² Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Российская Федерация, 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

*e-mail: m.b.baikenova@urfu.ru

Поступила в редакцию 29.10.2020 г.

После доработки 14.01.2021 г.

Принята к публикации 08.02.2021 г.

В связи с высокой распространенностью сахарного диабета (СД) и его осложнений большой интерес представляют инсулин⁺-клетки, обнаруженные в различных органах, которые, вероятно, могут частично компенсировать дефицит инсулина при сахарном диабете. Транскрипционные факторы, такие как Pdx1, MafA и Ngn3 играют важную роль в развитии и функционировании поджелудочной железы. Так, Pdx1 необходим как на начальных этапах развития поджелудочной железы, так и в процессе дифференцировки и созревания β -клеток. MafA имеет важное значение в функциональной активности островковых β -клеток. Ngn3 важен для образования эндокринных клеток-предшественников. Цель исследования: дать характеристику инсулин⁺-клеток печени и оценить экспрессию транскрипционных факторов Pdx1, MafA и Ngn3, вовлеченных в их дифференцировку, при аллоксановой модели СД1 и стрептозотоцин-никотинамидной модели СД2. Эксперимент проводился на крысах-самцах линии Wistar. В крови экспериментальных животных определяли концентрацию глюкозы, гликированного гемоглобина, инсулина, выполняли глюкозотолерантный тест, рассчитывали индекс НОМА-IR. Экспрессию Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺ исследовали иммуногистохимически. Клетки инсулин⁺, Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺ были обнаружены в печени как здоровых животных, так и животных с экспериментальными моделями СД 1-го и 2-го типа. Наибольшее число инсулин⁺-клеток определяется у животных со стрептозотоцин-никотинамидной моделью СД2, при этом клетки локализуются во всех зонах печеночной дольки. При аллоксановой модели СД1 данные клетки определяются в большей степени в периферической зоне печеночной дольки. Выявлены различия в количестве Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток печени у интактных животных и при экспериментальном моделировании СД. Была установлена корреляция между количеством клеток Ngn3⁺ и инсулин⁺ клеток в аллоксан-индуцированном СД, а также между количеством MafA⁺ клеток и инсулин⁺ клеток в обоих типах экспериментального СД. Установлено, что у животных с экспериментальными моделями СД в печени возрастает число инсулин⁺, Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток относительно интактных животных. В зависимости от модели СД меняется локализация инсулин⁺-клеток, а также их количество. Вместе с тем обнаружено, что число Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток увеличивается при аллоксановой модели СД, относительно стрептозотоцин-никотинамидной модели СД2. Выявлена корреляционная связь между количеством инсулин⁺-клеток и MafA⁺-клеток как при СД1, так и при СД2, и между количеством инсулин⁺-клеток и Ngn3⁺-клеток только при СД1.

Ключевые слова: сахарный диабет, печень, гепатоциты, инсулин⁺-клетки, Pdx1, MafA и Ngn3

DOI: 10.31857/S0044452921030037

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на принципиальные различия в патогенезе СД1 и СД2, при обоих типах заболевания имеет место изменение количества и секреторной активности β -клеток поджелудочной железы. Если

для СД1 снижение количества β -клеток характерно с начала заболевания, то при СД2 масса функционирующих β -клеток снижается значительно медленнее и становится значимой при многолетнем течении болезни [1, 2]. Исследования последних

лет направлены на поиск возможности замещения потери β -клеток поджелудочной железы для достижения стабильного эугликемического состояния [3]. Восстановление массы инсулин-продуцирующих клеток можно рассматривать в качестве альтернативной стратегии терапии СД.

Известно, что инсулин⁺-клетки ранее были обнаружены в головном мозге, костном мозге, селезенке, жировой ткани и печени [4, 5].

Поскольку клетки печени и поджелудочной железы в онтогенезе имеют энтодермальное происхождение, заслуживает внимания способность гепатоцитов дифференцироваться в инсулин-продуцирующие клетки [6]. Кроме того, зрелые гепатоциты и β -клетки поджелудочной железы демонстрируют сходство в профилях экспрессии генов, включая гены, кодирующие транскрипционные факторы, транспортер глюкозы GLUT2 и глюкозофосфорилирующий фермент глюкокиназу [7]. Ключевыми факторами транскрипции в развитии поджелудочной железы являются Pdx1, Ngn3 и MafA. Pdx1 необходим для роста почки поджелудочной железы, Ngn3 — для образования эндокринных клеток-предшественников и MafA для созревания бета-клеток. [8].

Транскрипционный фактор Pdx1 участвует не только в раннем развитии поджелудочной железы, а также в дифференцировке и созревании β -клеток. Вместе с тем Pdx1 связывается с регуляторными элементами гена инсулина и увеличивает транскрипцию м-РНК инсулина [9]. Ngn3 необходим для формирования эндокринных клеток-предшественниц при развитии поджелудочной железы [8]. Мыши с нокаутом Ngn3 характеризовались отсутствием эндокринных клеток в островках поджелудочной железы, следовательно, экспрессия Ngn3 необходима для развития всех типов эндокринных клеток поджелудочной железы у мышей [10]. Транскрипционный фактор MafA посредством регуляции синтеза инсулина и GLUT2 имеет решающее значение для функциональной активности β -клеток. MafA функционирует как непосредственный активатор гена инсулина и обнаруживается уже в зрелых β -клетках [11]. Вместе с тем у мышей db/db и в панкреатических островках людей с СД2 было обнаружено снижение уровня MafA, что расценивают как признак секреторного дефекта β -клеток [12].

Цель данного исследования — дать характеристику инсулин⁺-клеток печени и оценить экспрессию транскрипционных факторов Pdx1, MafA и Ngn3, вовлеченных в их дифференцировку, при аллоксановой модели СД1 и стрептозотоцин-никотинамидной модели СД2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Эксперимент на животных был выполнен в соответствии с принципами Директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС и одобрен этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (Протокол № 04/19 от 18.12.2019).

Эксперимент выполнен на 25 крысах-самцах линии Wistar. Экспериментальные животные были распределены на 3 группы: 1-я — интактные животные ($n = 10$), 2-я — животные с аллоксановой моделью сахарного диабета 1-го типа (СД1), ($n = 8$), 3-я — животные со стрептозотоцин-никотинамидной моделью сахарного диабета 2-го типа (СД2) ($n = 7$).

СД1 моделировали путем внутрибрюшинного введения аллоксана, разведенного в 0.85% растворе хлорида натрия, в суммарной дозе 170 мг/кг массы тела животного по модифицированной авторской методике [13]. Для моделирования СД2 животным вводили внутрибрюшинно стрептозотоцин, разведенный в цитратном буфере в дозе 65 мг/кг массы тела животного, с предварительным (за 15 мин) внутрибрюшинным введением водного раствора никотинамида в дозе 110 мг/кг массы тела животного [14]. Животных выводили из эксперимента на 30-е сутки после индукции диабета. Перед выведением животные были лишены пищи за 12 ч до эксперимента, доступ к воде оставляли свободным. Предварительно у крыс брали кровь из хвостовой вены для верификации воспроизведения моделей СД. После проведения срединной лапаротомии у животных извлекали печень. Фрагменты ткани фиксировали в 10% водном растворе нейтрального формалина в течение 24 ч. После 8-часовой промывки материал подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия) с последующей заливкой материала в парафин в системе Leica EG 1160 (Leica Microsystems, Германия). Срезы изготавливали на микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия) толщиной 3–4 мкм.

В крови животных определяли концентрацию глюкозы, гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) и инсулина. Концентрацию глюкозы определяли в плазме крови глюкозооксидазным методом наборами реагентов производства “Вектор-Бест” (Россия) HbA_{1c} — в цельной крови методом колоночной хроматографии низкого давления наборами “Гликометест” (“Элта”, Россия). Концентрацию инсулина в плазме крови определяли иммуноферментным методом с использованием набора Rat/Mouse Insulin ELISA (Millipore, США) на иммуноферментном автоматическом анализаторе LAZURITE (Dynex Technologies, США). Для верификации СД2 дополнительно оценивали толерант-

ность к глюкозе и инсулинорезистентность (индекс НОМА-IR). При проведении теста толерантности к глюкозе животным после 12-часового голодания перорально с помощью стальных зондов для перорального дозирования (VetTech Solutions Ltd., Великобритания) вводился раствор глюкозы в

воде в дозе 1 г/кг массы тела животного. Образцы крови были собраны в 0, 30, 60 и 120 мин [15]. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом. Индекс НОМА-IR для оценки инсулинорезистентности рассчитывали по формуле 1.

Формула 1 Оценка инсулинорезистентности

$$\text{НОМА-IR} = \frac{\text{инсулин натощак(мкЕд/мл)} \times \text{глюкоза натощак(ммоль/л)}}{22.5}$$

Иммуногистохимический и иммунофлюоресцентный анализ проводили с использованием антител к инсулину и проинсулину (clone INS04+INS05, Invitrogen, США), к Pdx1 (Abcam, США) и антител к MafA и Ngn3 (Biorbyt, Великобритания) по стандартным протоколам производителей антител. Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:200 и инкубировали при 4°C в течение 16 ч. Выявление инсулина велось с использованием авидин-биотин-пероксидазного комплекса, для выявления Pdx1 использовали козы IgG (H + L) к антигенам мыши, конъюгированные с флуоресцентным красителем (Thermo Fisher, США), для выявления MafA и Ngn3 использовались козы IgG (H + L) к антигенам кролика, также конъюгированные с флуоресцентным красителем (Thermo Fisher, США). Для проверки протокола и исключения неспецифического окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контроля. Позитивным контролем для иммуногистохимического выявления инсулина, Pdx1, MafA и Ngn3 являлись срезы поджелудочной железы intactных крыс [16, 17]. Негативный контроль окрашивания производили на аналогичных срезах поджелудочной железы по соответствующим протоколам, исключая первичные антитела [17, 18].

Для подсчета инсулин⁺-клеток использовался световой микроскоп Leica (Leica DM 2500, Германия) при увеличении X400, анализ изображений выполняли в программе Leica Application Suite (Leica, Германия), подсчет Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток осуществляли на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении X400 с использованием программы ZEN 2.0 (Carl Zeiss, Германия).

Подсчитывали количество инсулин⁺, Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток в печеночных пластинках во всех зонах печеночной долики в 20 полях зрения каждого образца с пересчетом на 1 мм² среза печени.

Статистическую обработку проводили с помощью программ Statistica 6.0 (DELL, США) и Microsoft Excel 2003 (Microsoft, США). Данные представлены в виде среднего $\pm$ ошибки среднего ($M \pm m$).

Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок применялся непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, а также критерий Краскела–Уоллиса. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости $p < 0.05$. Для выявления взаимосвязи количества Pdx1⁺ MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток и инсулин⁺-клеток вычисляли коэффициент парной линейной корреляции (*r*) Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для верификации моделей СД в крови исследуемых групп определяли концентрацию глюкозы, HbA_{1c} и инсулина. В результате было установлено, что в крови крыс с экспериментальным аллоксановым и стрептозотоцин-никотинамидным диабетом отмечалось достоверное увеличение концентрации глюкозы и HbA_{1c} по сравнению с показателями intactных животных. В группе крыс с аллоксановым диабетом отмечалось снижение концентрации инсулина в плазме крови относительно таковой в intactной группе в 2.6 раза, тогда как при стрептозотоцин-никотинамидной модели концентрации инсулина в плазме крови не обнаруживала статистически значимых отличий от intactной группы, что принципиально отличает данную модель от аллоксанового диабета (табл. 1).

Для верификации модели СД2 был проведен пероральный глюкозотолерантный тест. Установлено, что гликемия натощак и через 30, 60 и 120 мин после нагрузки глюкозой у животных с моделью СД2 была статистически значимо выше гликемии у intactных животных в 1.6 – 2.1 раза. Гликемия натощак у животных со стрептозотоцин-никотинамидным сахарным диабетом составила 9.9 ± 0.3 , а через 2 ч после нагрузки глюкозой — 11.15 ± 0.7 ммоль/л (рис. 1), что указывало на формирование СД.

Также для верификации модели СД2 был установлен индекс инсулинорезистентности НОМА-IR. Полученные данные свидетельствуют об увеличении индекса НОМА-IR у животных с экспериментальной моделью СД 2 на 74% по сравнению с intactными, что свидетельствовало о формировании ин-

Таблица 1. Показатели массы тела, концентрации глюкозы, HbA_{1c}, инсулина и индекса НОМА-IR в экспериментальных группах, M ± m

Показатель Экспериментальная группа Index Experimental group	Интактные животные Intact animals	Животные с аллоксановым сахарным диабетом Animals with alloxan-induced diabetes mellitus	Животные со стрептозотоцин-никотинамидным сахарным диабетом Animals with streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes mellitus
Масса тела животных перед выведением из эксперимента Body weight of animals before euthanasia	312 ± 5.5	270 ± 5.8*	294 ± 6.8*#
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	5.0 ± 0.3	10.9 ± 0.5*	10.9 ± 0.5*
HbA _{1c} , %	4.4 ± 0.3	6.7 ± 0.8*	6.6 ± 1.0*
Инсулин, мкг/л Insulin, µg/L	1.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1*	1.0 ± 0.1 [#]
Индекс НОМА-IR	6.7 ± 1.1	5.8 ± 0.4*	11.6 ± 0.5*#

* — различие по сравнению с показателем интактной группы ($p < 0.05$);# — различие по сравнению с показателем группы аллоксанового диабета ($p < 0.05$).

сулинорезистентности, характерной для СД2 (табл. 1).

Инсулин⁺-клетки определялись в печени всех исследуемых групп. При аллоксановом диабете инсулин⁺-клетки отмечались преимущественно вблизи портальных трактов, тогда как при стрептозотоцин-никотинамидном диабете данные клетки были обнаружены во всех зонах печеночной дольки.

Морфометрический анализ показал, что содержание инсулин⁺-клеток увеличивается у животных с экспериментальным СД по сравнению с аналогичным показателем у интактных животных. Наибольшее количество инсулин⁺-клеток наблюдает-

ся у группы со стрептозотоцин-никотинамидным диабетом, превышая приблизительно в 11 и 6 раз число данных клеток у здоровых животных и крыс с аллоксановым диабетом соответственно.

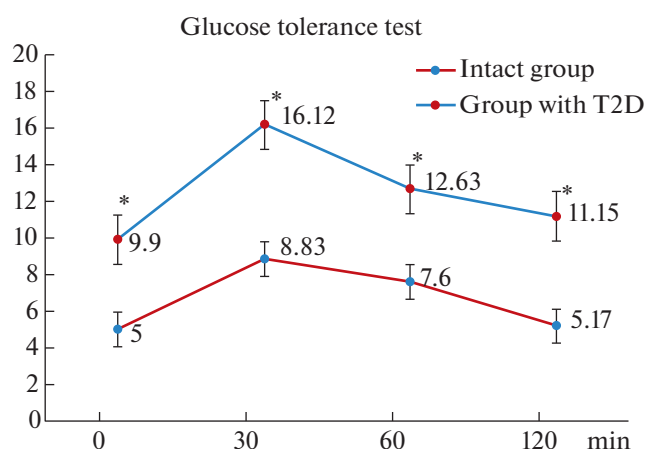
Иммунофлуоресцентное окрашивание печени показало присутствие Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток, которые определялись у интактной группы и групп с обеими моделями диабета (рис. 2).

Однако при сравнении количества Pdx1⁺-клеток у интактных животных и животных с экспериментальным СД увеличение числа данных клеток было зафиксировано только у животных с аллоксановым диабетом.

У групп с СД обнаруживалось достоверное увеличение количества MafA⁺-клеток. При аллоксановом диабете число MafA⁺-клеток превышает аналогичный показатель интактной группы в 2 раза, тогда как при стрептозотоцин-никотинамидном диабете количество данных клеток выше в 1.5 раза.

Анализ числа Ngn3⁺-клеток показал, что количество этих клеток одинаково в контроле и у крыс с обеими моделями СД (табл. 2).

Для выявления взаимосвязи количества Pdx1⁺ MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток и числа инсулин⁺-клеток вычисляли коэффициент парной линейной корреляции. Результаты корреляционного анализа показали слабую обратную корреляцию между количеством инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток. Взаимосвязь между инсулин⁺-клетками и MafA⁺-клетками характеризуется высоким положительным коэффи-

**Рис. 1.** Тест толерантности к глюкозе.

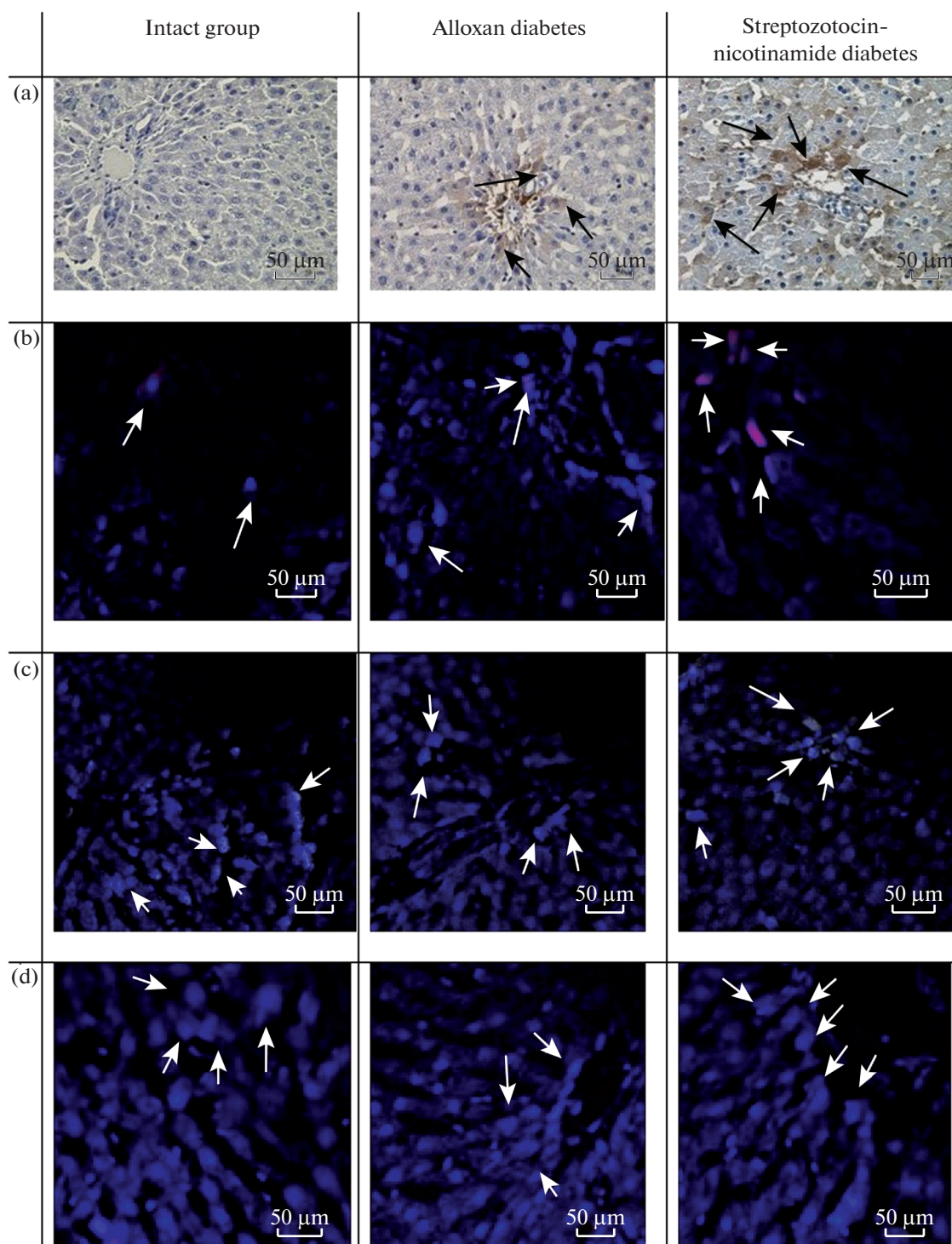


Рис. 2. Печень intactных животных, животных с аллоксановым и стрептозототцин-никотинамидным диабетом. Иммуногистохимическое окрашивание на инсулин (а) и иммуногистохимическое (иммунофлуоресцентное) окрашивание на Pdx1, MafA и Ngn3 (b, c и d). Стрелками показаны инсулин⁺-клетки, Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клетки. Увеличение ×400.

циентом парной линейной корреляции как при обоих типах экспериментального диабета. В то же время между количеством инсулин⁺-клеток и Ngn3⁺-клеток при аллоксановом диабете обнару-

жена высокая обратная корреляция, тогда как при стрептозототцин-никотинамидном диабете отмечается более низкая взаимосвязь этих параметров (табл. 3).

Таблица 2. Количество инсулин⁺-клеток, Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток в печени (шт./мм² среза органа), М ± m

Показатель Index	Интактные животные Intact animals	Животные с аллоксановым сахарным диабетом Animals with alloxan-induced diabetes mellitus	Животные со стрептозо- тоцин-никотинамидным сахарным диабетом Animals with streptozo- cin-nicotinamide-induced diabetes mellitus
Количество инсулин ⁺ -клеток в 1 мм ² среза печени, N/мм ² Number of hepatic insulin ⁺ cells, N per 1 mm ² of section	14.3 ± 0.8	24.9 ± 2.4*	151.5 ± 7.3*#
Количество Pdx1 ⁺ -клеток в 1 мм ² среза печени, N/мм ² Number of hepatic Pdx1 ⁺ cells, N per 1 mm ² of section	32.1 ± 2.1	42.7 ± 1.6*	34.1 ± 2.5
Количество MafA ⁺ -клеток в 1 мм ² среза печени, N/мм ² Number of hepatic MafA ⁺ cells, N per 1 mm ² of section	17.3 ± 1.0	34.6 ± 1.1*	25.6 ± 2.7*#
Количество Ngn3 ⁺ -клеток в 1 мм ² среза печени, N/мм ² Number of hepatic Ngn3 ⁺ cells, N per 1 mm ² of section	91.0 ± 2.5	90.6 ± 2.7	91.9 ± 2.0

* — различие по сравнению с показателем интактной группы ($p < 0.05$);# — различие по сравнению с показателем группы аллоксанового диабета ($p < 0.05$).**Таблица 3.** Коэффициенты парной линейной корреляции между количеством инсулин⁺-клеток и Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клеток печени у крыс

Тип клеток Hepatic cell type	Инсулин ⁺ -клетки при аллоксановом сахарном диабете Insulin ⁺ cells, alloxan-induced diabetes mellitus	Инсулин ⁺ -клетки при стрептозотоцин- никотинамидном сахарном диабете Insulin ⁺ cells, streptozotocin- nicotinamide-induced diabetes mellitus
Pdx1 ⁺ -клетки печени/Pdx1 ⁺ cells	−0.49	−0.25
MafA ⁺ -клетки печени/MafA ⁺ cells	0.88	0.70
Ngn3 ⁺ -клетки печени/Ngn3 ⁺ cells	−0.87	−0.18

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

СД характеризуется хронической гипергликемией, вызванной абсолютным дефицитом инсулина при СД1 и секреторным дефектом β-клеток в сочетании с инсулинорезистентностью при СД2 [19]. Восстановление массы и функциональной активности β-клеток можно рассматривать в качестве перспективной стратегии для лечения обоих типов диабета. Тот факт, что β-клетки поджелудочной железы являются не единственным источником секреции инсулина в организме, подтверждается рядом исследований: данные клетки были найдены в экзокринной части поджелудочной железы, печени, жировой ткани, костном мозге и селезенке, а также в головном мозге. Согласно литературным данным, обнаруженные инсулин⁺-клетки в печени определялись как у диабетических животных, так и у здоровых, причем доказано, что инсулин был

синтезирован именно этими клетками [4]. Вероятно, в норме данные клетки содержатся в организме в небольшом количестве, и при возникновении гипергликемии и связанной с ней СД количество внепанкреатических инсулин⁺-клеток увеличивается. Однако, несмотря на имеющиеся в литературе данные, механизм самопроизвольного появления внепанкреатических инсулин⁺-клеток остается до конца не изученным.

Гепатоциты представляют собой потенциальную мишень для преобразования в инсулин-продуцирующие клетки, ввиду энтодермального происхождения, общих характеристик их раннего развития, включая экспрессию общих регуляторных транскрипционных факторов [6].

Инсулин⁺-клетки определяются в печени как здоровых животных, так и у крыс с экспериментальными моделями СД 1-го и 2-го типа. Данные

инсулин⁺-клетки гистологически по структуре, размерам и расположению соответствуют гепатоцитам. Количество и локализация данных клеток неодинаковы при различных типах диабета. При стрептозотоцин-никотинамидном диабете инсулин⁺-гепатоциты отмечаются в большем количестве и обнаруживаются на протяжении всей печеночной дольки. Тогда как при аллоксановом диабете данные клетки характеризуются небольшим количеством в сравнении со стрептозотоцин-никотинамидной моделью и отмечаются преимущественно в периферической зоне печеночной дольки. Одной из возможных причин их образования считают гипергликемию. Перипортальные гепатоциты (в периферической зоне) имеют доступ к насыщенной кислородом крови из печеночной артерии и питательным веществам, доставляемым из кишечника с портальным кровотоком. Уровень кислорода и питательных веществ снижается по направлению к центральной вене (к центральной зоне печеночной дольки) [20]. В ряде работ было показано образование инсулин⁺-клеток при изменении уровня глюкозы [21]. В нашем эксперименте мы исключаем влияние данного фактора, поскольку гликемия при моделировании обоих типов СД достоверно не отличалась. Можно предположить, что инсулинорезистентность играет определяющую роль в возникновении этих клеток, а наличие инсулина в гепатоцитах связано с нарушением функции инсулинового рецептора и последующей интернализацией гормона в цитоплазму гепатоцита. Однако в экспериментах Н. Кojima и соавт. установлено, что эти клетки могут самостоятельно синтезировать инсулин [4].

Развитие поджелудочной железы и дальнейшая ее деятельность регулируются группой транскрипционных факторов. Среди основных, задействованных в созревании, функционировании β -клеток и секреции инсулина в них выделяют — Pdx1, Ngn3, MafA [22].

В срезах печени исследуемых групп были обнаружены Pdx1⁺, MafA⁺ и Ngn3⁺-клетки, количество которых отличалось в зависимости от типа СД. Так, число Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток увеличивается у животных с экспериментальным СД относительно здоровых животных. Однако достоверное увеличение числа Pdx1⁺-клеток обнаруживается только при аллоксановом диабете, тогда как количество MafA⁺-клеток при аллоксановом диабете превышает показатель интактной группы в 2 раза, при стрептозотоцин-никотинамидном диабете — в 1.5 раза, что указывает на дальнейшее формирование этих клеток в инсулин⁺-клетки. Анализ числа Ngn3⁺-клеток показал, что данный показатель остается одинаковым у всех исследуемых групп,

отсюда можно предположить, что неизменное количество этих клеток указывает на наличие предшественников эндокринных клеток, которые при возникновении определенных факторов способны дать начало инсулин-продуцирующим клеткам.

Анализ парной линейной корреляции показал высокую положительную взаимосвязь между количеством инсулин⁺- и MafA⁺-клеток при обоих типах экспериментального СД. В то же время высокий коэффициент парной линейной корреляции указывал на обратную зависимость между количеством инсулин⁺- и Ngn3⁺-клеток, однако, только при моделировании СД 1-го типа. Между количеством инсулин⁺- и Pdx1⁺-клеток отмечалась слабая отрицательная корреляция. Так, у животных с аллоксановым диабетом количество инсулин⁺-клеток в печени меньше, однако, количество Pdx1⁺-клеток увеличивается по сравнению с группой стрептозотоцин-никотинамидного диабета. Известно, что Pdx1 также играет важную роль в формировании раннего панкреатического эпителия, в то время как MafA способен регулировать гены, участвующие в функции β -клеток, такие как GLUT2, GLP1R (рецептор глюкагоноподобного пептида-1), что может указывать на отсутствие взаимосвязи между показателями инсулин⁺-клеток и транскрипционных факторов [23]. Однако наличие в печени транскрипционных факторов поджелудочной железы говорит о том, что инсулин⁺-клетки печени способны в определенных условиях синтезировать инсулин.

Известно, что Ngn3 может быть обнаружен в поджелудочной железе взрослого грызуна только после определенных типов повреждений, когда он временно экспрессируется экзокринными клетками, подвергающимися перепрограммированию в эндокринную сторону. Экспрессия Ngn3 в экзокринной части поджелудочной железы указывает на дедифференцирующую клеточную популяцию, способную функционировать подобно эндокринным клеткам [24]. Развитие печени и поджелудочной железы в процессе органогенеза в примитивной вентральной энтодерме, возможно, оставило обе ткани с плюрипотентными клетками, которые способны дать начало как печеночной, так и панкреатической линиям [25]. Например, клетки со свойствами, практически идентичными свойствам овальных клеток печени, также могут появляться в поджелудочной железе, особенно после абляции ацинарных клеток [26].

В литературе описано несколько процессов перепрограммирования гепатоцитов в инсулин-продуцирующие панкреатические клетки. Одним из наиболее распространенных является аденовирусная трансдукция одного или нескольких ключевых

транскрипционных факторов поджелудочной железы. Экспрессия выбранных генов приводила к увеличению содержания иммунореактивного инсулина в печени и в плазме крови [27, 28]. Установлено, что перепрограммированные гепатоциты демонстрировали секрецию инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой и были способны предотвращать гипергликемию [29]. Также имеются данные, указывающие на синтез инсулина в печени животных при гипергликемии. Так, в исследовании R. Ghosh и соавт. показан синтез инсулина в гепатоцитах, культивируемых с глюкозой, а также в меньшем содержании в контрольной группе [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что инсулин⁺-клетки определяются в печени здоровых крыс и крыс при экспериментальном моделировании СД 1-го и 2-го типа. Установлена зависимость количества инсулин⁺-клеток от типа СД. Вместе с тем было обнаружено, что в зависимости от типа СД меняется и локализация данных клеток. Также в зависимости от типа СД изменялось количество Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток. При моделировании СД1 инсулин⁺-клеток отмечалось меньшее количество по сравнению с моделью СД2, тогда как число Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток увеличивалось. При моделировании СД2, напротив, количество инсулин⁺-клеток увеличивается, при этом число Pdx1⁺ и MafA⁺-клеток снижается относительно группы с моделью СД1. Исходя из этого можно предположить, что большое количество инсулин⁺-клеток сопровождается уменьшением Pdx1 и MafA. Число Ngn3⁺-клеток оставалось одинаковым во всех исследуемых группах. Ngn3 действует как своего рода переключатель, определяющий судьбу эндокринных клеток у панкреатических предшественников [30].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках выполнения бюджетных тем ИИФ УрО РАН: № АААА-А18-118020590108-7; № АААА-А18-118020590107-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

М. Байкенова — работа с экспериментальными животными, выполнение лабораторной части исследования, статистическая обработка результатов исследования; В.А. Черешнев — обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания; К.В. Соколова — работа с экспериментальными животными, выполнение лабораторной части исследования, статистическая обработка результатов исследования; И.Ф. Гетте — разработка концепции и дизайна исследования, постановка эксперимента, моделирование СД; В.В. Емельянов — анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; И.Г. Данилова — анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vieira A., Druelle N., Avolio F., Napolitano T., Navarro-Sanz S., Silvano S., Collombat P.* (2017) β -Cell Replacement Strategies: The Increasing Need for a " β -Cell Dogma". *Front Genet* 8:75. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00075>
2. *Bergman R.N., Ader M., Huecking K., Van Citters G.* (2002) Accurate assessment of β -cell function: the hyperbolic correction. *Diabetes* 51 (1): 212–220. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S212>
3. *Zhou Q., Melton D.A.* (2018) Pancreas regeneration. *Nature* 557 (7705): 351–358. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0088-0>
4. *Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., Nakahara T., Hara M., Chan L.* (2004) Extrapancratic insulin producing cells in multiple organs in diabetes. *PNAS* 101 (8): 2458–2463. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308690100>
5. *Beamish C.A., Strutt B.J., Arany E.J., Hill D.J.* (2016) Insulin-positive, Glut2-low cells present within mouse pancreas exhibit lineage plasticity and are enriched within extra-islet endocrine cell clusters. *Islets* 8 (3): 65–82. <https://doi.org/10.1080/19382014.2016.1162367>
6. *Ruzittu S., Willnow D., Spagnoli F.M.* (2020) Direct Lineage Reprogramming: Harnessing Cell Plasticity between Liver and Pancreas. *Spring Harb Perspect Biol* 12 (7): a035626. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035626>
7. *Zalzman M., Gupta S., Giri R.K., Berkovich I., Sappal B.S., Karnieli O., Zern M.A., Fleischer N., Efrat S.* (2003) Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (12): 7253–7258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1136854100>
8. *Akinci E., Banga A., Tungatt K., Segal J., Eberhard D., Dutton J.R., Slack J.M.W.* (2013) Reprogramming of Various Cell Types to a Beta-Like State by Pdx1, Ngn3 and MafA. *PLoS ONE* 8 (11): e82424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082424>

9. Jennings R.E., Berry A.A., Kirkwood-Wilson R., Roberts N.A., Hearn T., Salisbury R.J., Blaylock J., Piper Hanley K., Hanley N.A. (2013) Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. *Diabetes* 62 (10): 3514–3522.
<https://doi.org/10.2337/db12-1479>
10. Schonhoff S.E., Giel-Moloney M., Leiter A.B. (2004) Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types. *Developmental Biology* 270 (2): 443–454.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.03.013>
11. Olbrot M., Rud J., Moss L.G., Sharma A. (2002) Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (10): 6737–6742.
<https://doi.org/10.1073/pnas.102168499>
12. Conrad E., Stein R., Hunter C.S. (2014) Revealing transcription factors during human pancreatic β cell development. *Trends Endocrinol Metab* 25 (8): 407–414.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.013>
13. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. (2014) Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент на изобретение №2534411. [Danilova I.G., Gette I.F. (2014) Method for modeling alloxan diabetes. Patent RF. № 2534411 (In Russ)].
14. Спасов А.А., Воронкова М.П., Сингур Г.Л., Чепляева Н.И., Чепурнова М.В. (2011) Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. *Биомедицина* (3): 12–18. [Spasov A.A., Voronkova M.P., Singur G.L., Chepljaeva N.I., Chepurnova M.V. (2011) Experimental model of type 2 diabetes. *Biomedicine* (3): 12–18. (In Russ.)].
15. Eyth E., Basit H., Smith C.J. (2020) *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Updated*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532915/>
16. Hewitt S.M., Baskin D.G., Frevert C.W., Stahl W.L., Rosa-Molinar E. (2014) Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *J Histochem Cytochem* 62 (10): 693–697.
<https://doi.org/10.1369/0022155414545224>
17. Seeberger K.L., Anderson S.J., Ellis C.E., Yeung T.Y., Korbitt G.S. (2014) Identification and differentiation of PDX1 β -cell progenitors within the human pancreatic epithelium. *World J Diabetes* 5 (1): 59–68.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i1.59>
18. Kumar G.L., Rudbeck L. (2011) Иммуногистохимические методы: Руководство. Москва. [Kumar G.L., Rudbeck L. (2011) *Immunohistochemical Methods: A Manual*. Moscow].
19. Yechoor V., Liu V., Paul A., Lee J., Buras E., Ozer K., Samson S., Chan L. (2009) Gene Therapy with Neurogenin 3 and Betacellulin Reverses Major Metabolic Problems in Insulin-Deficient Diabetic Mice. *Endocrinology* 150 (11): 4863–4873.
<https://doi.org/10.1210/en.2009-0527>
20. Davies S.P., Reynolds G.M., Stamatakis Z. (2018) Clearance of Apoptotic Cells by Tissue Epithelia: A Putative Role for Hepatocytes in Liver Efferocytosis. *Front Immunol* 9 (44): 1–15.
21. Ghosh R., Karmohapatra S.K., Bhattacharya G., Sinha A.K. (2010) The glucose-induced synthesis of insulin in liver. *Endocrine* 38 (2): 294–302.
<https://doi.org/10.1007/s12020-010-9388-3>
22. Gittes G.K. (2009) Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. *Developmental Biology* 236 (1): 4–35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
23. Matsuoka T., Kawashima S., Miyatsuka T., Sasaki S., Shimo N., Katakami N., Kawamori D. (2017) MafA Enables Pdx1 to Effectively Convert Pancreatic Islet Progenitors and Committed Islet α -Cells Into β -Cells In Vivo. *Diabetes* 66 (5): 1293–1300.
<https://doi.org/10.2337/db16-0887>
24. Gomez D.L., Sheets T.P., Hruban R.H., Oberholzer J., McGarrigle J.J., Shambloot M.J. (2015) Neurogenin 3 Expressing Cells in the Human Exocrine Pancreas Have the Capacity for Endocrine Cell Fate. *Plos One* 10 (8): e0133862.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133862>
25. Deutsch G., Jung J., Zheng M., Lora J., Zaret K.S. (2001) A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128 (5): 871–881.
26. Meivar-Levy I., Sapir T., Berneman D., Weissbach T., Polak-Charcon S., Ravassard P., Tzakis A.G., Mor E., Ricordi C., Ferber S. (2011) Human Liver Cells Expressing Albumin and Mesenchymal Characteristics Give Rise to Insulin-Producing Cells. *J Transplantation Article ID* 252387.
<https://doi.org/10.1155/2011/252387>
27. Ferber S., Halkin A., Cohen H., Ber I., Einav Y., Goldberg I., Barshack I., Seijffers R., Kopolovic J., Kaiser N., Karasik A. (2000) Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 6: 568c572.
<https://doi.org/10.1038/75050>
28. Zhu Y., Liu Q., Zhou Z., Ikeda Y. (2017) PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther* 8:240–245.
<https://doi.org/10.1186/s13287-017-0694-z>
29. Banga A., Greder L., Dutton J., Slack J.M.W. (2014) Stable insulin-secreting ducts formed by reprogramming of cells in the liver using a three-gene cocktail and a PPAR agonist. *Gene Ther* 21:19–27.
<https://doi.org/10.1038/gt.2013.50>
30. Gradwohl G., Dierich A., LeMeur M., Guillemot F. (2000) Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (4): 1607–1611.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1607>

INSULIN-POSITIVE CELLS AND MAJOR TRANSCRIPTION FACTORS (Pdx1, MafA AND Ngn3) IN THE LIVER OF ANIMALS IN RAT EXPERIMENTAL MODELS OF TYPE 1 AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS

M. Baikenova^{a,b,#}, V. A. Chereshev^{a,b}, K. V. Sokolova^{a,b}, I. F. Gette^{a,b},
V. V. Emelyanov^b, and I. G. Danilova^{a,b}

^a Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

^b B.N. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

[#]e-mail: m.b.baikenova@urfu.ru

Due to a high occurrence of diabetes mellitus (DM) and its complications, insulin-positive cells detected in different organs are of great interest as they can probably partially compensate for insulin deficiency in diabetes mellitus. The development of pancreatic β -cells is regulated by the consecutive expression of transcription factors, among which Pdx1, MafA and Ngn3 are most extensively explored. Specifically, these factors have been reported to be able to transdifferentiate a broad variety of cell types into insulin-positive cells. The goal of this study was to characterize insulin-positive (insulin⁺) cells in the liver and to evaluate the expression of transcription factors Pdx1, MafA and Ngn3 involved in their differentiation in an alloxan-induced rat model of type 1 diabetes mellitus (T1D) and streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes mellitus (T2D). Experiments were carried out on male Wistar rats. In experimental animals, plasma levels of glucose, glycosylated hemoglobin and insulin were determined. The oral glucose tolerance test was performed and the insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated. The expression of Pdx1⁺, MafA⁺ and Ngn3⁺ was investigated immunohistochemically. Insulin⁺, Pdx1⁺, MafA⁺ and Ngn3⁺ cells were detected in the liver both of healthy animals and those with experimental models of T1D and T2D. The largest number of insulin⁺ cells was found in animals with streptozotocin-nicotinamide-induced T2D, wherein cells were localized throughout the hepatic lobule. In an alloxan-induced model of T1D, these cells were detected mainly at the periphery of the hepatic lobule. The number of Pdx1⁺, MafA⁺ and Ngn3⁺ hepatic cells was different in intact animals vs. those with experimental DM. A correlation was established between the number of Ngn3⁺ cells and insulin⁺ cells in alloxan-induced DM, as well as between the number of MafA⁺ cells and insulin⁺ cells in both types of experimental DM. Thus, in rats with both experimental models of DM, the number of insulin⁺, Pdx1⁺ and MafA⁺ cells in the liver increases compared to intact animals. Localization and the number of insulin⁺ cells varies depending on the experimental model of DM. At the same time, the number of Pdx1⁺ and MafA⁺ cells increases in an alloxan-induced model of T1D compared to a streptozotocin-nicotinamide-induced model of T2D. There is a correlation between the number of insulin⁺ and MafA⁺ cells both in T1D and T2D models and between the number of insulin⁺ and Ngn3⁺ cells in a T1D model only.

Keywords: diabetes mellitus, liver, hepatocytes, insulin-positive cells, Pdx1, MafA, Ngn3

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ОБОЛОЧКАМИ, НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА СТИМУЛИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

© 2021 г. Я. Г. Торопова^{1,*}, М. Н. Горшкова¹, Д. С. Моторина¹, Д. В. Королев¹, Ю. А. Скорик^{1,2}, Г. А. Шульмейстер¹, Е. Ю. Подъячева¹, А. Я. Багров³

¹ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУН Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: yana.toropova@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.2021 г.

После доработки 24.03.2021 г.

Принята к публикации 03.04.2021 г.

Среди всего многообразия отдельный интерес представляют наночастицы на основе оксида железа ввиду наличия магнитных свойств, возможности придания им необходимых физико-химических свойств, а также модификации их поверхности биосовместимыми, биоактивными материалами, лигандами и антителами. Важным аспектом, определяющим возможность и спектр клинического применения наночастиц, является профиль биосовместимости. Учитывая опосредованный активными формами кислорода (АФК) механизм в реализации токсического эффекта наночастиц, особое внимание на этапе их разработки для биомедицинских применений должно уделяться оценке их безопасности с позиции развития окислительного стресса. В связи с этим в данной работе было изучено дозозависимое влияние наночастиц магнетита (МНЧ), модифицированных различными оболочками (на основе полилактида, полисахарида и альбумина), на генерацию АФК, стимулированными клетками крови человека, а также на динамику индуцированного окислительного гемолиза эритроцитов. Установлено, что МНЧ с оболочкой из полилактида, альбумина и полисахарида в диапазоне всех используемых концентраций (0.1–2.0 мг/мл) в условиях всего периода инкубации (0–180 мин) не влияют на кинетику хемилюминесцентного ответа, обеспечивая при этом однонаправленное, но различное по выраженности снижение максимальной интенсивности индуцированной хемилюминесценции и суммарной выработки АФК. Все виды исследуемых наночастиц в ряду концентраций 1.0–2.0 мг/мл обеспечивают дозозависимое усиление данного влияния. В условиях индуцированной генерации АФК различные оболочки МНЧ не обуславливают изменения оказываемых эффектов, регулируя лишь их интенсивность. Максимальным эффектом обладают МНЧ с оболочкой из полилактида.

Ключевые слова: наночастицы магнетита, оболочка, цельная кровь, индуцированная хемилюминесценция, гемолиз, АФК, дозозависимость

DOI: 10.31857/S0044452921040069

ВВЕДЕНИЕ

Наноматериалы обладают целым рядом свойств, обуславливающих их пригодность для широкого спектра биомедицинских применений. Наночастицы характеризуются наноразмерностью (от 1 до 100 нм) и большой площадью поверхности, которые в значительной степени определяют их уникальные физико-химические свойства. На сего-

дняшний день большое количество наночастиц находится на стадии разработки [1–3], в то время как их отдельные виды уже используются в клинической практике или находятся на стадии клинических испытаний [4, 5]. Среди всего многообразия отдельный интерес представляют наночастицы на основе оксида железа ввиду наличия магнитных свойств, возможности придания им необходимых для обеспечения конкретного биологического эф-

фекта физико-химических свойств за счет изменений условий синтеза, а также модификации их поверхности биосовместимыми, биоактивными материалами, лигандами и антителами [6, 7]. Кроме того, магнитные свойства наноразмерного оксида железа обуславливают их многофункциональность, поскольку определяют возможность их нагрева для обеспечения магнитной гипертермии, применяющейся для деструктивного воздействия на опухоль [8], а также возможность управления их накоплением в определенных участках тела с помощью приложенного внешнего магнитного поля в рамках обеспечения адресной доставки лекарственных средств [9]. Сочетание диагностических свойств [10] с возможностью обеспечения адресной доставки лекарств позволяет рассматривать наночастицы магнетита (МНЧ) в качестве перспективных агентов для тераностики, предполагающих совмещение терапевтического воздействия с отслеживанием результатов лечения [11].

Ключевым аспектом, определяющим возможность и спектр клинического применения наночастиц, является профиль биосовместимости, характеризующий характер и выраженность взаимодействия наночастиц с биологическими структурами на уровне клеток, тканей и органов. С учетом ключевой роли опосредованного активными формами кислорода (АФК) механизма в реализации токсического эффекта наночастиц, особое внимание на этапе их разработки для биомедицинских применений должно уделяться оценке их безопасности с позиции развития окислительного стресса [12]. Известно, что биологический эффект наночастиц определяется множеством факторов, среди которых можно выделить размер, форму, характеристику поверхности, а также наличие оболочки и ее качественный состав [13].

Ранее в условиях *in vitro* и *in vivo* было показано ингибирующее время- и дозозависимое влияние МНЧ с немодифицированной поверхностью и покрытых различными оболочками, на выработку свободных радикалов. Полученные результаты позволили предполагать вероятность связывания указанными наночастицами АФК, а также возможную взаимосвязь эффекта с качественным составом оболочки наночастиц [14, 15]. Между тем в другой работе [16] было показано, что МНЧ с различными оболочками обеспечивают усиление выработки АФК клетками цельной крови.

Для того, чтобы составить представление о возможных ингибирующих эффектах наночастиц оксида железа, модифицированных различными оболочками, в отношении генерации АФК, необходимо изучить их эффекты в условиях стимулированной выработки АФК с сопоставлением полученных результатов с характеристиками наночастиц, их дозой, а также длительностью воздействия.

Целью данной работы явилось сравнительное изучение дозозависимого влияния МНЧ с различными оболочками на динамику генерации АФК стимулированными клетками крови человека, а также на динамику гемолиза эритроцитов в условиях индуцированного окислительного стресса. Для модификации поверхности МНЧ были выбраны оболочки на основе сложного полиэфира молочной кислоты, поликонденсированной глюкозы и на основе сывороточного альбумина. Выбор оболочек обусловлен относительной изученностью, биоразлагаемостью и степенью биосовместимости данных полимеров, позволяющих использовать их в медицинских целях, в том числе и в качестве средства адресной доставки лекарств за счет включения последних в состав оболочки [17–19].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись МНЧ с оболочками на основе сложного полиэфира молочной кислоты (полилактид), на основе поликонденсированной глюкозы (полисахарид) и на основе альбумина (МНЧ + полилактид, МНЧ + полисахарид и МНЧ + альбумин соответственно). Синтез МНЧ описан в работе [20]. Модификацию поверхности МНЧ различными оболочками осуществляли описанными ранее методами [16, 21, 22]. Гидродинамический радиус, индекс полидисперсности (PDI) и электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) наночастиц исследовался методами динамического и электрофоретического рассеяния света на приборе Photocor Compact-Z (Photocor, Россия).

Опытные группы были сформированы в соответствии с исследуемыми наночастицами: МНЧ + полилактид, МНЧ + полисахарид и МНЧ + альбумин. Группами контроля являлись образцы крови с добавлением эквивалентного объема физиологического раствора (ФР). Объем выборки в каждой экспериментальной группе составил 8 образцов. Для оценки дозозависимости исследуемые виды МНЧ изучали в концентрациях 0.2, 1.0 и 2.0 мг/мл.

Генерацию АФК и выраженность индуцированного окислительного гемолиза эритроцитов в условиях воздействия модифицированных различными оболочками МНЧ проводили в условиях *in vitro* в соответствии с Хельсинкской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2013 ред.) с использованием свежей гепаринизированной цельной крови человека, полученной от некурящих мужчин в возрасте 20–35 лет.

Генерацию АФК изучали с помощью метода индуцированной люминолзависимой клеточной хемилюминесценции (ХЛ) на хемилюминометре Lum-1200 (ДИСофт, Россия), позволяющей определить

степень связывания наночастицами АФК, генерируемых клетками крови при их стимуляции зимозаном.

Предварительно были подготовлены растворы люминола (1 мМ) и зимозана (2.0 мг/мл). Для каждого вида МНЧ готовили инкубационную взвесь: к 100 мкл крови при постоянном перемешивании добавляли 100 мкл раствора МНЧ. Полученную взвесь инкубировали при комнатной температуре при постоянном перемешивании на возвратно-поступательном шейкере (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия) при 200 об/мин.

С целью измерения ХЛ каждого образца к 100 мкл инкубационной взвеси добавляли 700 мкл раствора Хэнкса и 100 мкл раствора люминола, после чего в каждую кювету добавляли 100 мкл опсонизированного зимозана с дальнейшей регистрацией показателей индуцированной ХЛ в течение 30 мин.

Оценивали следующие показатели: интегральные значения интенсивности ХЛ (S_{ind}), характеризующие суммарный синтез АФК за 30 мин исследования; время достижения максимальной интенсивности ХЛ (X_{max}), характеризующее скорость развития ХЛ-реакции; максимальную интенсивность свечения (I_{max}), отражающую максимальный уровень синтеза АФК [23]. Из регистрируемых значений ХЛ вычитали фоновое свечение хемилюминометра. Регистрация данных проходила в формате записи последовательно измеряемых значений интенсивности ХЛ и отображалась в виде графиков в программе PowerGraph.

Изучение выраженности индуцированного окислительного гемолиза эритроцитов проводили с помощью спектрофотометра SQ-2802S (UNICO, США) на взвеси изолированных эритроцитов, отделенных от плазмы и других форменных элементов крови посредством центрифугирования в режиме 10 мин при 2800 об/мин. Изолированные эритроциты трехкратно промывали в 0.9% физиологическом растворе. Полученную эритроцитарную массу разбавляли забуференным физиологическим раствором (0.15 М натрия хлорида и 0.01 М натрий-фосфатного буферного раствора, pH 7.4) до получения конечной взвеси. К полученной взвеси добавляли гипохлорит натрия (NaOCl) в концентрации 250 мМ. В опытных группах сразу после добавления индуктора окислительного гемолиза осуществляли помещение в инкубационную взвесь исследуемых видов МНЧ (1:1 по отношению к объему взвеси). Для оценки количества освобожденного гемоглобина осуществляли измерение оптической плотности полученных образцов ($\lambda = 540$ нм) на спектрофотометре UNICO-2802S (UNICO SYS, США) на следующих дискретных точках: 5 мин после добавления индуктора (исходный уровень), через 60 и 180 мин индукции окислительного стресса [14] при постоянном перемешивании на возврат-

но-поступательном шейкере (Heidolph, Германия) (200 об/мин) и комнатной температуре.

В качестве позитивного контроля выступали образцы со 100%-ным гемолизом, индуцированным добавлением 0.01% раствора додецилсульфата натрия при соотношении образец: реагент 1 : 10. За негативный контроль принимали образцы с добавлением 0.9% физиологического раствора.

Коэффициент гемолиза (КГ) рассчитывали с использованием уравнения:

$$\text{КГ, \%} = (\text{ОП}_{\text{оп}} - \text{ОП}_{\text{нк}}) / (\text{ОП}_{\text{пк}} - \text{ОП}_{\text{нк}}) * 100\%,$$

где ОП – оптическая плотность ($\lambda = 540$ нм), нк – негативный контроль, пк – позитивный контроль, оп – опытный образец.

За контрольные принимались значения, полученные после добавления в инкубационную среду NaOCl при отсутствии воздействия МНЧ. Регистрацию изучаемых параметров в каждом образце на каждой дискретной точке осуществляли в трехкратных повторях.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы “Graph-PadPrism 8”. Проверку гипотезы о равенстве средних выборок проводили методами дисперсионного анализа для повторных измерений, в независимых выборках – с использованием критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

Ограничения данной работы:

В настоящем исследовании не производилась оценка изменений физико-химических характеристик наночастиц до и после нанесения оболочек, а также в условиях их инкубации с цельной кровью человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основные физико-химические характеристики МНЧ (морфология, гидродинамический радиус и ζ -потенциал) изучены нами в предыдущей работе [16] и для удобства обобщены в табл. 1.

По данным электронной микроскопии [16] все виды исследуемых МНЧ характеризуются сферической формой. МНЧ с оболочкой из альбумина и полилактида обладают близким к нулю электрокинетическим потенциалом, тогда как МНЧ с оболочкой из полисахарида характеризуется значительным отрицательным ζ -потенциалом. По-видимому, это связано со значительным количеством концевых карбоксильных групп, образовавшихся в результате синтеза полисахарида из глюкозы гидротермальным методом [22]. Методом динамического светорассеяния показано, что во всех случаях

Таблица 1. Характеристика наночастиц магнетита, покрытых различными оболочками [16]

Вид наночастиц	Форма	Средний гидродинамический радиус, нм	PDI	ζ - потенциал МНЧ, покрытых оболочками, мВ
МНЧ + полилактид	Сферическая	$122 \pm 38^*$	0.10	-0.1 ± 2.7
МНЧ + полисахарид	Сферическая	66 ± 19	0.08	-21.4 ± 0.9
МНЧ + альбумин	Сферическая	$192 \pm 58^*$	0.09	4.0 ± 2.2

Примечание: * $p < 0.05$ по сравнению с МНЧ + полисахарид.

распределение частиц по размеру является мономодальным, при этом гидродинамический радиус МНЧ + полисахарид был в 2–3 раза меньше по сравнению с образцами МНЧ + полилактид и МНЧ + альбумин. PDI во всех случаях был менее 0.1 (табл. 1), что свидетельствует о достаточно узком распределении МНЧ по размеру.

Динамика параметров индуцированной ХЛ цельной крови в условиях воздействия МНЧ с различными оболочками в концентрациях 0.2, 1.0 и 2.0 мг/л отражена в табл. 2.

Время достижения максимальной интенсивности свечения индуцированной ХЛ ($X_{\max}$), характеризующее скорость развития “респираторного взрыва” и отражающее специфический ответ фагоцитов на стимул (зимозан), во всех исследуемых группах при использовании всего диапазона концентраций (0.2–2.0 мг/мл) МНЧ в динамике эксперимента оставалось на уровне исходных значений ($p > 0.05$ по сравнению с исходным, между группами). Данный факт косвенно свидетельствует об отсутствии влияния всех видов МНЧ на скорость образования АФК.

Максимальная интенсивность ХЛ, отражающая максимальный уровень синтеза АФК, в группе контроля на всех этапах эксперимента не изменялась, оставаясь на уровне исходных значений ($p > 0.05$ по сравнению с исходным). Добавление в инкубационную среду всех видов МНЧ в диапазоне концентраций 0.2–1.0 мг/мл не обеспечивало изменения $I_{\max}$ через 5 мин после воздействия. На фоне влияния указанных концентраций МНЧ + полилактид через 60 мин инкубации отмечалось достоверное снижение данного показателя (относительно контрольных значений, а также значений в группах с воздействием МНЧ + альбумин и МНЧ + полисахарид), сохраняющееся к моменту окончания эксперимента (180 мин инкубации). При использовании всех исследуемых видов МНЧ в максимальных концентрациях (2.0 мг/мл) через 5 мин их воздействия отмечалось достоверное равнозначное снижение максимальной интенсивности свечения относительно контрольных значений, сохраняющееся на всех этапах эксперимента. Максимальным

эффектом в отношении снижения показателя $I_{\max}$ обладали МНЧ с оболочкой из полилактида.

Интегральное значение интенсивности индуцированной ХЛ (S_{ind}), отражающее суммарный синтез АФК, в группе контроля в динамике эксперимента не претерпевало изменений. На фоне 5-минутного воздействия всех видов МНЧ во всем диапазоне концентраций (0.2–2.0 мг/мл) данный показатель не изменялся относительно контрольных значений. При использовании МНЧ + полилактид через 60 мин инкубации отмечалось достоверное снижение данного показателя относительно контрольных значений, сохраняющееся к 180-й минуте воздействия. Данный эффект отмечался при использовании всех концентраций МНЧ + полилактид и характеризовался дозозависимостью — увеличение концентрации обуславливало более выраженное снижение суммарного синтеза АФК. МНЧ с оболочками из полисахарида и альбумина в концентрации 2.0 мг/мл через 60 мин воздействия также обеспечивали снижение S_{ind} , которое характеризовалось меньшей выраженностью по сравнению с МНЧ + полилактид.

Динамика индуцированного окислительного гемолиза в условиях воздействия различных концентраций (0.2–2.0 мг/мл) исследуемых видов МНЧ представлена на рис. 1.

При воздействии NaClO в динамике эксперимента наблюдалось увеличение КГ. Так, через 60 мин после добавления NaClO в инкубационную среду данный показатель составил 22%, тогда как на момент окончания эксперимента — 38%.

Минимальные концентрации (0.2 мг/мл) МНЧ с оболочками из полисахарида и альбумина не обуславливали изменений КГ относительно контрольных значений. В условиях 180-минутного воздействия МНЧ + полилактид в концентрации 0.2 мг/мл отмечалось снижение КГ относительно контрольных значений на 29.2% (после 60 мин инкубации) и 36% (после 180 мин инкубации).

При использовании МНЧ в концентрации 1.0 мг/мл динамика КГ значимо не менялась относительно таковой при использовании минимальных концентраций МНЧ. Максимальное снижение ГК от-

Таблица 2. Динамика интенсивности индуцированной ХЛ цельной крови в условиях воздействия МНЧ с различными оболочками в концентрациях 0.2, 1.0 и 2.0 мг/мл

Концентрация МНЧ, мг/мл	Вид МНЧ	Время инкубации, мин/Incubation time, min		
		5	60	180
X _{max} , с				
0.2	МНЧ + полилактид	926 ± 102	940 ± 118	1041 ± 39
	МНЧ + альбумин	852 ± 88	835 ± 50	717 ± 154
	МНЧ + полисахарид	938 ± 115	893 ± 106	1137 ± 202
1.0	МНЧ + полилактид	1008 ± 115	866 ± 102	1008 ± 137
	МНЧ + альбумин	859 ± 45	828 ± 108	819 ± 57
	МНЧ + полисахарид	886 ± 60	1147 ± 134	957.00 ± 26
2.0	МНЧ + полилактид	967 ± 43	1159 ± 150	981 ± 88
	МНЧ + альбумин	725 ± 81	816 ± 92	849 ± 127
	МНЧ + полисахарид	967 ± 92	1015 ± 126	855 ± 127
0	Контроль	783 ± 56	948 ± 141	831 ± 112
I _{max} , имп/с				
0.2	МНЧ + полилактид	9 ± 3	3,4 ± 0.8 ^{*/##}	2.7 ± 0,6 ^{***/##}
	МНЧ + альбумин	12 ± 5	9,5 ± 1.4 ^{\$\$\$}	19 ± 6 ^{\$\$\$}
	МНЧ + полисахарид	15 ± 5	13 ± 5 ^{\$\$\$}	10 ± 5 ^{\$\$}
1.0	МНЧ + полилактид	7 ± 5	1.3 ± 0.2 ^{***/###}	1.8 ± 0,5 ^{***/###}
	МНЧ + альбумин	7.9 ± 1,7	9.1 ± 1.8 ^{\$\$\$}	10.0 ± 1.7 ^{\$\$\$}
	МНЧ + полисахарид	7 ± 2	4.4 ± 1.6 ^{\$}	4.6 ± 1.1 ^{\$}
2.0	МНЧ + полилактид	5 ± 3 [*]	0.8 ± 0.3 ^{***/##/@}	1.4 ± 0.2 ^{***/##/@}
	МНЧ + альбумин	5.5 ± 1.4 [*]	3.3 ± 0.7 ^{***/@}	3.8 ± 0.9 ^{***/@}
	МНЧ + полисахарид	5.0 ± 1.2 ^{*/@@@}	5 ± 2 ^{*/@}	3.4 ± 1.1 ^{***/@@@}
0	Контроль	15 ± 6	11 ± 5	13 ± 5
S _{ind} , о.е.				
0.2	МНЧ + полилактид	11197 ± 3873	4331 ± 1024 ^{***}	3364 ± 766 ^{***}
	МНЧ + альбумин	15299 ± 5990	17615 ± 4912	27727 ± 9497
	МНЧ + полисахарид	18086 ± 5106	15755 ± 5840	12977 ± 6101
1.0	МНЧ + полилактид	8584 ± 5759	1635 ± 326 ^{***}	2258 ± 602 ^{***}
	МНЧ + альбумин	10620 ± 2157	11812 ± 2315	13285 ± 1919
	МНЧ + полисахарид	9731 ± 2814	5397 ± 1977 [*]	5955 ± 1317 [*]
2.0	МНЧ + полилактид	6304 ± 3698	988 ± 360 ^{***}	1695 ± 305 ^{***}
	МНЧ + альбумин	7054 ± 1655	4263 ± 938 ^{***/\$}	5097 ± 1188 ^{***/\$}
	МНЧ + полисахарид	6535 ± 3608	6128 ± 2873 ^{*/\$\$\$}	4284 ± 1341 ^{***/\$}
0	Контроль	20600 ± 8446	15507 ± 6490	16096 ± 6165

Примечание: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ — по сравнению с контролем. # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$, ### $p < 0.0001$ — по сравнению с исходными значениями в данной группе. \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.001$, \$\$\$ $p < 0.0001$ — по сравнению со значениями в группе МНЧ + полилактид в аналогичной концентрации и на аналогичной точке. @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.001$, @@@ $p < 0.0001$ — по сравнению с данным видом МНЧ в минимальной концентрации на аналогичной точке.

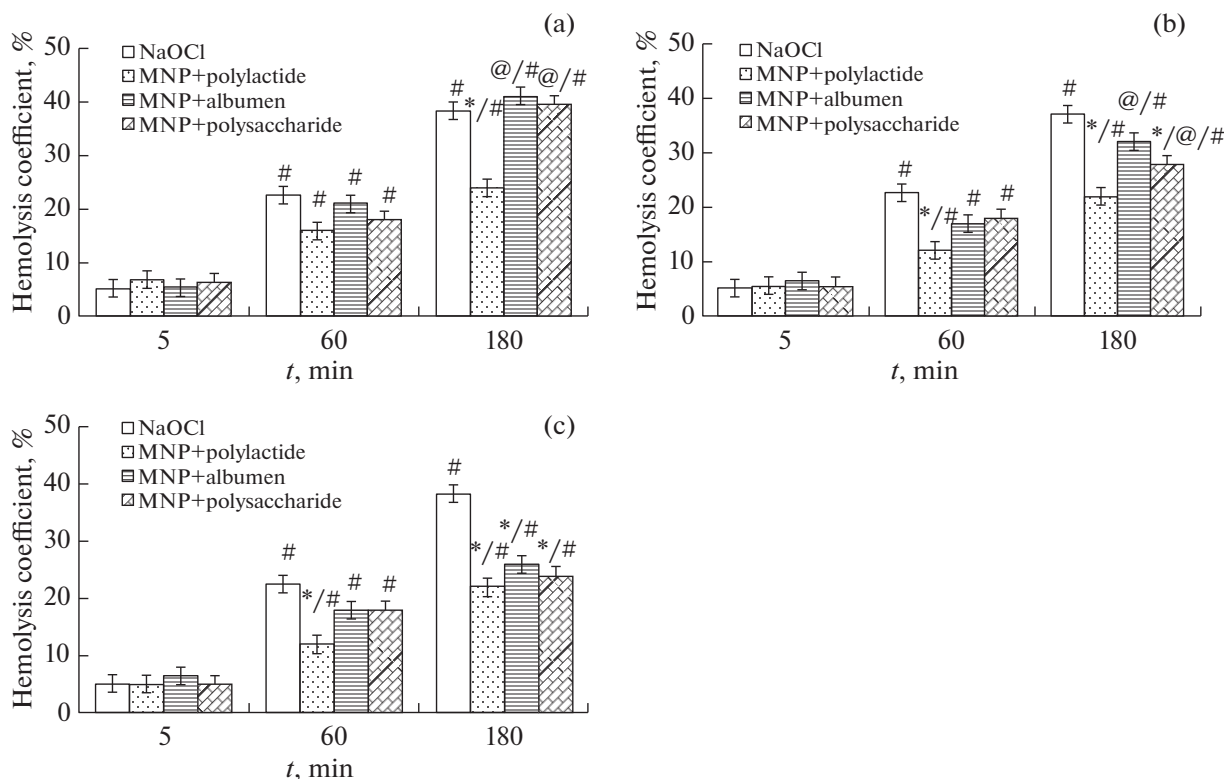


Рис. 1. Коэффициент гемолиза в динамике 180-минутного воздействия МНЧ с различными оболочками. (а) Концентрация всех видов МНЧ 0.2 мг/мл; (б) Концентрация всех видов МНЧ 1.0 мг/мл; (с) Концентрация всех видов МНЧ 2.0 мг/мл. Примечание: * $p < 0.05$ – по сравнению с контролем; @ $p < 0.05$ – по сравнению со значениями в группе МНЧ + полилактид в аналогичной концентрации и на аналогичной точке; # $p < 0.05$ – по сравнению с исходными значениями в данной группе.

носителем контрольных значений обеспечивали МНЧ + полилактид – на 49% (после 60 мин) и на 40% после 180 мин инкубации. МНЧ с оболочкой из полисахарида в указанной концентрации через 180 мин воздействия обеспечивали защитный эффект в отношении окислительного гемолиза – ГК в данной группе на момент окончания эксперимента оказался на 8% ниже относительно контрольных значений.

При использовании всех видов МНЧ в максимальных концентрациях (2.0 мг/мл) через 180 мин их воздействия отмечалось равнозначное снижение ГК (31–41%) относительно контрольного уровня.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время магнитные наночастицы оксида железа рассматриваются как перспективные материалы для решения широкого спектра биомедицинских задач. Поверхностная модификация магнитных наночастиц позволяет не только повысить их биосовместимость, но и придать им необходимые для конкретного планируемого клинического использования свойства (например, обеспе-

чение дозирования лекарственного препарата за счет его контролируемого высвобождения с поверхности наночастиц, тропности к конкретным органам-мишеням и т.д.). При этом качественный состав оболочки в значительной степени определяет биологические эффекты наночастиц [13]. С учетом ключевой роли АФК-опосредованного механизма в реализации их токсического эффекта, в настоящем исследовании изучали дозозависимое влияние МНЧ, модифицированных различными оболочками (на основе полилактоида, полисахарида и альбумина), на генерацию АФК стимулированными клетками крови человека, а также на динамику индуцированного окислительного гемолиза эритроцитов.

Установлено, что МНЧ с оболочкой из полилактоида, альбумина и полисахарида в диапазоне всех используемых концентраций (0.1–2.0 мг/мл) в условиях всего периода инкубации (0–180 мин) не влияют на кинетику хемилюминесцентного ответа, обеспечивая при этом однонаправленное, но различное по выраженности снижение максимальной интенсивности индуцированной ХЛ и суммарной выработки АФК. Все виды исследуемых МНЧ в ряду концентраций 1.0–2.0 мг/мл обеспечивают дозозави-

симое усиление данного влияния. Максимальным эффектом при этом обладают МНЧ + полилактид. Полученные данные позволяют предполагать наличие антиоксидантного эффекта у исследуемых видов МНЧ в условиях индуцированного окислительного стресса, различающегося по степени выраженности в зависимости от качественного состава оболочки МНЧ и их физических характеристик. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты, полученные при изучении влияния МНЧ на изолированные эритроциты, находящиеся в условиях окислительного стресса. Так, показано, что МНЧ с оболочками из полисахарида и альбумина в диапазоне концентраций 0.2–1.0 мг/мл не влияют на степень индуцированного окислительного гемолиза. При этом увеличение концентрации данных видов МНЧ (2.0 мг/мл) при 180-минутном воздействии обеспечивает защитный эффект в виде снижения индуцированного окислительного гемолиза. МНЧ с оболочкой из полилактида во всем диапазоне используемых концентраций (0.2–20 мг/мл) обеспечивают снижение степени окислительного гемолиза эритроцитов.

Следует отметить, что в условиях индуцированной генерации АФК различные оболочки МНЧ не обуславливают изменения их оказываемых эффектов, регулируя лишь их интенсивность. Максимальным эффектом при этом обладают МНЧ с оболочкой из полилактида.

Большое количество работ свидетельствует о том, что наночастицы оксида железа за счет высокой реакционной способности обеспечивают увеличение выработки АФК, что может рассматриваться, с одной стороны, как один из ключевых механизмов токсичности данного вида наночастиц, а с другой стороны, может являться основой для их АФК-опосредованного воздействия на опухолевую ткань с целью лечения [24–27]. При этом продемонстрировано, что покрытие наночастиц оболочками может способствовать снижению их реакционной способности [28]. Однако, полученные в ходе настоящего исследования результаты согласуются с представлением отдельных авторов о возможности наночастиц оксида железа обеспечивать антиоксидантный эффект. Так, в отдельных работах показана антиоксидантная активность наночастиц оксида железа [29], а также зависимость выраженности данного эффекта от характеристик наночастиц (в частности, от размера) [30]. В связи с этим составленное в ходе экспериментальных исследований представление о влиянии МНЧ на выработку АФК может явиться основой для определения спектра их клинического использования.

Полученные в ходе настоящей работы данные имеют некоторое расхождение с результатами, полученными ранее авторами при оценке непосред-

ственного влияния вышеуказанных видов наночастиц на генерацию АФК клетками крови в условиях отсутствия воздействия АФК-индуцирующих стимулов. Так, Я.Г. Тороповой и соавт. было показано [16], что МНЧ с оболочкой из полисахарида обеспечивали дозозависимое повышение генерации АФК, в то время как МНЧ с оболочкой из полилактида не влияли на их выработку. В то же время МНЧ с оболочкой из альбумина при используемой концентрации 0.2 мг/мл повышали генерацию АФК, при этом при увеличении концентрации данного вида МНЧ эти изменения нивелировались. Полученные данные позволяют предполагать, что отсутствие воздействия МНЧ с оболочкой из полилактида на генерацию АФК обусловлено не их способностью к связыванию свободных радикалов, а их АФК-токсическим эффектом, реализующимся за счет индукции выработки большого количества АФК, приводящего к быстрому расходованию антиоксидантной емкости крови и окислительной модификации ее компонентов. Итогом данных событий могла явиться неспособность антиоксидантных систем редуцировать дальнейшее развитие окислительного стресса, что, в свою очередь, предположительно, обуславливало гибель клетки и ее неспособность к генерации АФК [16]. Принимая во внимание данное предположение, можно предполагать, что описанные различия обусловлены различными экспериментальными условиями. Вероятно, оказываемые эффекты МНЧ в отношении генерации АФК (а следовательно, и их потенциальная АФК-опосредованная токсичность) определяются не только такими общеизвестными факторами, как физико-химические характеристики наночастиц, их доза, длительность воздействия, но и условиями, в которых исходно находятся клетки-мишени для воздействия наночастиц. Полученные данные позволяют рекомендовать при разработке подходов к биомедицинскому использованию МНЧ в дополнение к стандартным тестам, посвященным оценке безопасности и эффективности МНЧ проведение комплексной оценки характера оказываемых воздействий МНЧ в отношении генерации АФК в условиях, отражающих основные звенья патогенеза конкретного заболевания, при котором планируется использование МНЧ. Так, условия, при которых проводилось изучение влияния МНЧ на генерацию АФК нативными клетками крови, отражают физиологический ответ клеток на воздействие МНЧ. В частности, в данных условиях МНЧ с оболочкой из полилактида проявляют АФК-опосредованную токсичность. В то же время в условиях воздействия МНЧ на клетки крови, уже находящиеся в условиях окислительного стресса, тот же вид МНЧ обеспечивает снижение генерации АФК. Можно предполагать, что реализация данного эффекта обеспечивается высвобождением

ионов железа при постепенной частичной деградации магнитного материала, концентрация которых является достаточной для разложения гидроперекисей [31]. При этом различия по выраженности оказываемых эффектов МНЧ с различными оболочками в отношении снижения генерации АФК в условиях индуцированного окислительного стресса обусловлены различиями в интенсивности их биodeградации. С другой стороны, нельзя исключать и влияние МНЧ на образование АФК клетками, находящимися в условиях окислительного стресса [14].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Я.Г.Т., А.Я.Б.), сбор данных (М.Н.Г., Д.С.М., Ю.А.С., Д.В.К., Ю.А.П., Г.А.Ш.), обработка данных (Я.Г.Т., М.Н.Г., Д.С.М.), написание и редактирование манускрипта (Я.Г.Т., Е.Ю.П.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yaqoob A.A., Ahmad H., Parveen T., Ahmad A., Oves M., Ismail I.M.I., Qari H.A., Umar K., Mohamad Ibrahim M.N.* (2020) Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. *Front Chem* 8: 1–23. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00341>
2. *Filipczak N., Pan J., Yalamarty S.S.K., Torchilin V.P.* (2020) Recent advancements in liposome technology. *Adv Drug Deliv Rev* 156: 4–22. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.022>
3. *Zahin N., Anwar R., Tewari D., Kabir M.T., Sajid A., Mathew B., Uddin M.S., Aleya L., Abdel-Daim M.M.* (2020) Nanoparticles and its biomedical applications in health and diseases: special focus on drug delivery. *Environ Sci Pollut Res* 27: 19151–19168. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05211-0>
4. *Anselmo A.C., Mitragotri S.* (2019) Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med* 4: 1–16. <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>
5. *Monk B.J., Herzog T.J., Wang G., Triantos S., Maul S., Knoblauch R., McGowan T., Shalaby W.S.W., Coleman R.L.* (2019) Gynecologic Oncology A phase 3 randomized, open-label, multicenter trial for safety and efficacy of combined trabectedin and pegylated liposomal doxorubicin therapy for recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.12.043>
6. *Srivastava V., Gusain D., Sharma Y.C.* (2015) Critical Review on the Toxicity of Some Widely Used Engineered Nanoparticles. *Ind Eng Chem Res* 54: 6209–6233.
7. *Zhu N., Ji H., Yu P., Niu J., Farooq M.U., Akram M.W., Udego I.O., Li H., Niu X.* (2018) Surface modification of magnetic iron oxide nanoparticles. *Nanomaterials* 8: 1–27. <https://doi.org/10.3390/nano8100810>
8. *Grüttner C., Müller K., Teller J., Westphal F.* (2013) Synthesis and functionalisation of magnetic nanoparticles for hyperthermia applications. *Int J Hyperther* 29: 777–789. <https://doi.org/10.3109/02656736.2013.835876>
9. *Gholami A., Mousavi S.M., Hashemi S.A., Chiang W., Parvin N.* (2020) Current trends in chemical modifications of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery in cancer chemotherapy. *Drug Metab Rev* 0: 1–20. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1726943>
10. *Vallabani N.V.S., Singh S.* (2018) Recent advances and future prospects of iron oxide nanoparticles in biomedicine and diagnostics. *3 Biotech* 8: 1–23. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1286-z>
11. *Kalash R.S., Lakshmanan V.K., Cho C.-S., Park I.-K.* (2016) Theranostics. In book *Biomaterials Nanoarchitectonics*.— Elsevier Inc. 197–215.
12. *Manke A., Wang L., Rojanasakul Y.* (2013) Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/942916>
13. *Singh N., Jenkins G.J.S., Asadi R., Doak S.H.* (2010) Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev* 1: 5358. <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>
14. *Торопова Я.Г., Печникова Н.А., Зелинская И.А., Королев Д.В., Гареев К.Г., Маркитантова А.С., Богусhevская В.Д., Поволоцкая А.В., Маньшина А.А.* (2018) Изучение гемосовместимости магнитных наночастиц магнетита и композитных частиц магнетита-кремнезема *in vitro*. *Бюл сиб мед* 17: 157–167. [*Toropova Ya.G., Pechnikova N.A., Zelinskaya I.A., Korolev D.V., Gareev K.G., Markitantova A.S., Bogushevskaya V.D., Povolotskaya A.V., Manshina A.A.* (2018) Study of hemocompatibility of magnetic magnetite nanoparticles and composite magnetite-silica particles *in vitro*. *Bul sib med* 17: 157–167. (In Russ)]. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-157-167>
15. *Toropova Y.G., Motorina D.S., Gorshkova M.N., Gareev K.G., Korolev D.V., Muzhikyan A.A.* (2020) The effect of intravenous administration to rats of magnetite nanoparticles with various shells on the functional state and morphology of the endothelium and on antioxidant status. *Transl Med* 7: 52–64. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2020-7-2-52-64>
16. *Торопова Я.Г., Моторина Д.С., Зелинская И.А., Королев Д.В., Шульмейстер Г.А., Скорик Ю.А.* (2021) Генерация активных форм кислорода клетками цельной крови человека при воздействии наночастиц на основе оксида железа, покрытых различными оболочками. *Бюллетень экспериментальной биологии и меди-*

- цины 171: 95–99. [Toropova Y.G., Motorina D.S., Zelin-skaya I.A., Korolev D.V., Shulmeister G.A., Skorik Y.A. (2021) Generation of reactive oxygen species by human whole blood cells when exposed to iron oxide nanoparticles coated with various membranes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 171: 95–99. (In Russ)].
17. DeStefano V., Khan S., Tabada A. (2020) Applications of PLA in modern medicine. *Eng Regen* 1: 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2020.08.002>
 18. Varanko A., Saha S., Chilkoti A. (2020) Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 156: 133–187. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.08.008>
 19. Wang K., Liu M., Mo R. (2020) Polysaccharide-Based Biomaterials for Protein Delivery. *Med Drug Discov* 7: 100031. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2020.100031>
 20. Toropova Y.G., Golovkin A.S., Malashicheva A.B., Korolev D.V., Gorshkov A.N., Gareev K.G., Afonin M.V., Galagudza M.M. (2017) In vitro toxicity of FemOn, FemOn-SiO₂ composite, and SiO₂-FemOn core-shell magnetic nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 12: 593–603. <https://doi.org/10.2147/IJN.S122580>
 21. Гареев К.Г., Пугач В.С., Евреинова Н.В., Наумишева Е.Б., Панов М.Ф., Королев Д.В. (2017) Разработка методов поверхностной модификации магнитных наночастиц защитной оболочкой из сахаридов. *Биотехносфера* 3: 76–81. [Gareev K.G., Pugach V.S., Evreinova N.V., Naumysheva E.B., Panov M.F., Korolev D.V. (2017) Development of methods for surface modification of magnetic nanoparticles with a protective shell of saccharides. *Biotechnosphere* 3: 76–81. (In Russ)].
 22. Zorin V.N., Naumisheva E.B., Postnov V.N., Evreinova N.V., Gareev K.G., Korolev D.V. (2018) Magnetic nanoparticles for medical application with a coating deposited with various methods. *J Phys Conf Ser* 1124. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1124/3/031009>
 23. Dogadin S.A., Dudina M.A., Savchenko A.A., Man'kovskii V.A., Gvozdev I.I. (2017) Respiratory burst activity in neutrophilic granulocytes in the onset of Graves' disease. *Probl Endokrinol (Mosk)* 63: 4–8. <https://doi.org/10.14341/probl20176314-8>
 24. Dayem A.A., Hossain M.K., Lee S. Bin, Kim K., Saha S.K., Yang G.M., Choi H.Y., Cho S.G. (2017) The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *Int J Mol Sci* 18: 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>
 25. Patil U.S., Adireddy S., Jaiswal A., Mandava S., Lee B.R., Chrisey D.B. (2015) In vitro/in vivo toxicity evaluation and quantification of iron oxide nanoparticles. *Int-JMolSci*, 16: 24417–24450.
 26. Sundarraj K., Raghunath A., Panneerselvam L., Perumal E. (2017) Iron oxide nanoparticles modulate heat shock proteins and organ specific markers expression in mice male accessory organs. *Toxicol Appl Pharmacol* 317: 12–24.
 27. Mai T., Hilt J.Z. (2017) Magnetic nanoparticles: reactive oxygen species generation and potential therapeutic applications. *J Nanoparticle Res* 19: 253. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3943-2>
 28. Wydra R.J., Rychahou P.G., Evers B.M., Anderson K.W., Dziubla T.D., Hilt J.Z. (2015) The role of ROS generation from magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field on cytotoxicity. *Acta Biomater* 25: 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.037>
 29. Tuzun B.S., Fafal T., Tastan P., Kivcak B., Yelken B.O., Kayabasi C., Susluer S.Y., Gunduz C. (2020) Structural characterization, antioxidant and cytotoxic effects of iron nanoparticles synthesized using *Asphodelus aestivus* Brot. aqueous extract. *Green Process Synth* 9: 153–163. <https://doi.org/10.1515/gps-2020-0016>
 30. Paul S., Saikia J.P., Samdarshi S.K., Konwar B.K. (2009) Investigation of antioxidant property of iron oxide particles by 1'-1' diphenylpicryl-hydrazyle (DPPH) method. *J Magn Magn Mater* 321: 3621–3623. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.07.004>
 31. Proskurnina E.V., Polimova A.M., Sozarukova M.M., Prudnikova M.A., Ametov A.S., Vladimirov Y.A. (2016) Kinetic Chemiluminescence as a Method for Oxidative Stress Evaluation in Examinations of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med* 161: 131–133. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3362-x>

INFLUENCE OF IRON OXIDE-BASED NANOPARTICLES MODIFIED BY DIFFERENT SHELLS ON THE GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN STIMULATED HUMAN BLOOD CELLS *in vitro*

Ya. G. Toropova^a, M. N. Gorshkova^a, D. S. Motorina^a, D. V. Korolev^a, Yu. A. Skorik^{a,b},
G. A. Shulmeister^a, E. Yu. Podyacheva^a, and A. Ya. Bagrov^c

^a V.A. Almazov National North-West Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

^b Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

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

Among the variety of nanoparticles, those based on iron oxide are of particular interest due to their biological safety, magnetic properties, as well as the possibility to give them the required physico-chemical properties and

to modifying their surface with biocompatible, bioactive materials, ligands and antibodies. An important aspect that determines the possibility and range of clinical applications of nanoparticles is their biocompatibility profile. Considering the mechanism mediated by reactive oxygen species (ROS) and involved in the implementation of the toxic effect of nanoparticles, special attention at the stage of their development for biomedical applications should be paid to assessing their safety in terms of the development of oxidative stress. In this regard, we studied the dose-dependent effect of magnetite nanoparticles (MNPs) modified with various shells (based on polylactide, polysaccharide, and albumin) on the generation of ROS in stimulated human blood cells, as well as on the dynamics of induced oxidative hemolysis of erythrocytes. It was found that MNPs with a shell of polylactide, albumin, and polysaccharide, in the range of all the used concentrations (0.1–2.0 mg/mL) and throughout the entire incubation period (0–180 min), do not affect the kinetics of the chemiluminescent response, while providing a unidirectional but differently pronounced decrease in the maximum intensity of induced chemiluminescence and total ROS production. All types of investigated nanoparticles in the range of concentrations from 1.0 to 2.0 mg/mL provide a dose-dependent enhancement of this effect. Under conditions of induced ROS generation, various MNP shells do not modify the effects of these nanoparticles and only regulate their intensity. MNPs with a polylactide shell have maximum effect.

Keywords: magnetite nanoparticles, shell, whole blood, induced chemiluminescence, hemolysis, ROS, dose dependence

ПОДАВЛЕНИЕ МАЛОНОВЫМ ДИАЛЬДЕГИДОМ И МЕТИЛГЛИОКСАЛЕМ ЭНДОТЕЛИЙ-ЗАВИСИМОЙ ДИЛАТАЦИИ ПОДВЗДОШНОЙ АРТЕРИИ КРЫС, ВЫЗЫВАЕМОЙ УВЕЛИЧЕНИЕМ КРОВОТОКА

© 2021 г. В. В. Ермишкин^{1,*}, Е. В. Лукошкова¹, А. М. Мелькумянц¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии, Москва, Россия

*e-mail: v.v.erm@mail.ru

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 11.02.2021 г.

Принята к публикации 02.04.2021 г.

Артериальные сосуды расширяются при увеличении скорости течения крови. Эта регуляция осуществляется благодаря способности эндотелиоцитов расслаблять гладкие мышцы при увеличении действующего на стенку напряжения сдвига. Ранее мы показали, что уменьшение деформируемости эндотелиоцитов димером глутарового альдегида (DGA) избирательно подавляет опосредуемую эндотелием способность артерий расширяться в ответ на увеличение кровотока. В настоящей работе в острых опытах на анестезированных крысах мы выясняли, обладают ли подобным свойством и продукты оксидативного и карбонильного стресса — малоновый диальдегид (MDA) и метилглиоксаль (MG). С этой целью регистрировали изменения гидравлической проводимости интактной подвздошной артерии, вызываемые увеличением в ней кровотока, до и после воздействия на сосудистую стенку MDA, либо MG, либо DGA. Одновременно, до и после этих воздействий, регистрировали реакцию артерии на внутриартериальное введение ацетилхолина (ACh), дилататорное действие которого опосредуется эндотелием, чтобы убедиться в сохранности функции эндотелия расслаблять гладкие мышцы. В наших экспериментах MDA и DGA избирательно подавляли дилатацию артерии в ответ на ступенчатое увеличение кровотока при сохранении практически неизменного ответа, вызываемого введением ACh. MG при сильно выраженном подавлении дилататорной реакции артерии на увеличение кровотока, как правило, уменьшал и ответ на ACh, но в значительно меньшей степени. Поскольку согласно новым представлениям механосенсором, обеспечивающим восприятие сосудистой стенкой напряжения сдвига, является эндотелиальный гликокаликс, полученные данные позволяют сделать вывод, что конечные продукты перекисного окисления липидов, образующиеся при оксидативном и карбонильном стрессе, повреждая эндотелиальный гликокаликс, могут приводить к дисфункции эндотелия, проявляющейся в утрате артериями способности регулировать гидравлическое сопротивление при изменениях скорости кровотока.

Ключевые слова: малоновый диальдегид, метилглиоксаль, димер глутарового альдегида, эндотелий-зависимая дилатация, механочувствительность эндотелия, гликокаликс

DOI: 10.31857/S0044452921040045

В наше время ни у кого не вызывает сомнений, что обусловленная функцией эндотелия регуляция кровеносных сосудов имеет важнейшее значение для нормального функционирования системы кровообращения. В частности, имеет место эндотелий-зависимое приспособление гидравлического сопротивления сосудов к величине текущего в них кровотока. Это свойство реализуется благодаря механочувствительности эндотелия, т.е. способности эндотелиоцитов реагировать на увеличение действующей на стенку сосуда со стороны текущей крови силы вязкого трения — напряжения сдвига [1, 2]. Механочувствительность эндотелия обеспечивает достижение максимального кровотока при рабочей гиперемии, ослабляет констрикторные ре-

акции, противодействуя тем самым развитию сосудистого спазма, и обеспечивает острую стадию развития коллатерального кровоснабжения при окклюзии магистральных стволов [2, 3]. Само собой разумеется, что повреждение способности эндотелия реагировать на изменения действующего на него со стороны текущей крови напряжения сдвига должно приводить к развитию ряда патологических состояний, таких, например, как спазм артерий, артериальная гипертензия, недостаточное кровоснабжение органов и тканей и т.п.

Первоначально полагали, что механорецептором сосудистой стенки является мембрана эндотелиоцитов, однако последующие исследования показали, что первичным механорецептором являют-

ся волокна эндотелиального гликокаликса [4–8]. Именно они, деформируясь под действием напряжения сдвига, передают механический сигнал на клетки эндотелия, которые, в свою очередь, деформируясь, выделяют оксид азота, расслабляющий сосудистые гладкие мышцы.

Еще до этих работ было показано, что величина дилататорного ответа артерий на повышение кровотока зависит от деформируемости эндотелиоцитов: чем выше деформируемость клеток эндотелия, тем в большей мере увеличивается диаметр сосуда в ответ на один и тот же стимул. Этот вывод был сделан на основании результатов опытов, осуществленных как на магистральных артериях кошек, так и на культуре эндотелиальных клеток. В опытах на перфузируемых *in situ* магистральных артериях кошек реакция на повышение кровотока значительно уменьшалась или полностью исчезала после кратковременного (в течение 30 с) воздействия на интиму артерий 0.01–0.025%-ными растворами димера глутарового альдегида (DGA) [9]. Измерения же, проведенные на культуре клеток эндотелия, показали, что такое воздействие DGA вызывает значительное увеличение жесткости эндотелиальных клеток [10] и, следовательно, уменьшает величину их сдвиговых деформаций, происходящих в ответ на повышение напряжения сдвига на стенке.

Результаты этих опытов позволили заключить, что любое воздействие, повышающее жесткость эндотелиальных клеток, должно вызывать ослабление эндотелий-зависимой дилатации, определяемой чувствительностью сосудистой стенки к напряжению сдвига. Однако использовавшийся в этих исследованиях DGA представляет собой биологический яд и в организме не встречается. В то же время продукты перекисного окисления липидов – малоновый диальдегид (MDA) и метилглиоксаль (MG) сходны по структуре с DGA и, по-видимому, должны также обладать способностью влиять на деформируемость эндотелиального гликокаликса и/или эндотелиоцитов [11]. При этом известно, что при оксидативном и карбонильном стрессе концентрация MDA и MG в крови человека может многократно возрастать от нормальных значений до величин, превосходящих норму на 1–3 порядка [12].

Цель предпринятого нами исследования состояла в том, чтобы выяснить, как влияют MDA и MG на регуляцию гидравлического сопротивления магистральной артерии крыс при изменениях скорости кровотока.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено 15 острых опытов на самцах крыс линии Вистар массой 414–562 г, наркотизированных уретаном (1.0–1.2 г/кг, внутривенно). Иссле-

дования проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях и рекомендациями Этического комитета НМИЦ кардиологии МЗ РФ. В ходе опыта животные находились на естественном дыхании. Температуру животных поддерживали на уровне 37°C, используя регулируемый термостатируемый столик и верхний ламповый обогрев.

Схема опыта представлена на рис. 1а. Крысам в положении лежа на спине производили трахеотомию для обеспечения нормального дыхания, после чего выделяли из тканей левую и правую бедренные артерии и правую бедренную вену для последующего канюлирования. Выделенные сосуды перевязывали дистально, после чего в левую бедренную артерию вводили длинную (20 мм) полиэтиленовую канюлю, которую продвигали почти до бифуркации аорты. Ее использовали для регистрации артериального давления (BP). Далее, в правую бедренную артерию вблизи пупартовой связки вводили небольшую (5 мм) тонкостенную (60 мкм) металлическую канюлю с наружным диаметром $d = 0.72$ мм, а в правую бедренную вену – канюлю из полиэтилена с наружным диаметром $d = 1.3$ мм. Перед началом измерений эти канюли подсоединяли к трубкам внешнего контура перфузии, предварительно заполненного раствором Рингера с гепарином (100 МЕ/мл), через вену дополнительно вводили гепарин (1000–1500 МЕ), после чего, плавно ослабляя винтовой зажим, запускали кровь в перфузионный контур.

Реакции подвздошной артерии крысы на изменение в ней кровотока и на внутриартериальное введение вазодилатора оценивали, регистрируя изменения гидравлической проводимости этой артерии. Гидравлическая проводимость сосуда есть отношение величины кровотока в нем к величине перепада давлений на его концах. Следовательно, для определения величины проводимости необходимо в каждый момент времени измерять кровоток в артерии и разность давлений на ее концах. Методика измерения проводимости артерии схематично изображена на рис. 1(а и б).

Измерение проводимости подвздошной артерии. Кровь из подвздошной артерии поступает во внешний перфузионный контур и, проходя через жесткую длинную трубку, имеющую гидравлическое сопротивление R_c , а затем через ограничитель потока Q (винтовой зажим на трубке), возвращается в организм по бедренной вене. Для определения кровотока измеряли перепад давлений $\Delta P_c = (P_1 - P_2)$ на постоянном гидравлическом сопротивлении (жесткой трубке), включенном последовательно с артерией, а разность давлений на концах артерии определяли, регистрируя перепад давлений $\Delta P_a = (P_{ao} - P_{fa})$ на тройниках, установленных на входе и выходе из подвздошной артерии (рис. 1а).

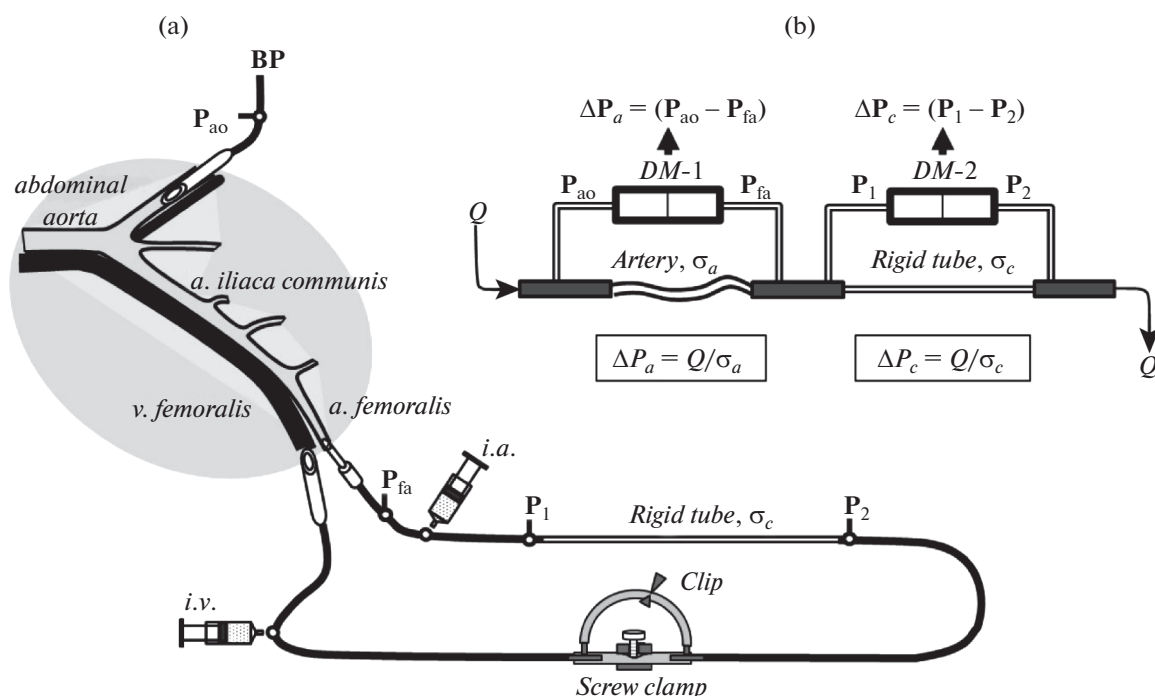


Рис. 1. Регистрация реакций подвздошной артерии крысы *in vivo*.

(а) — подвздошная артерия, перфузируемая кровью под системным артериальным давлением ВР. (Артерия не отпрепарована из окружающих тканей: область, незатронутая препаровкой, выделена серым цветом). Кровоток в артерии задается внешним перфузионным контуром, соединяющим бедренную артерию и бедренную вену. (б) — схема измерений. Перепад давлений на артерии $\Delta P_a = Q/\sigma_a$ зависит от величины потока Q и проводимости артерии σ_a . Перепад давлений на жесткой трубке $\Delta P_c = Q/\sigma_c$ отражает только изменение кровотока, т.к. $\sigma_c = \text{const}$. Поток Q , проходящий через артерию и трубку, одинаков. Для оценки гидравлической проводимости сосуда достаточно вычислить отношение перепадов давлений, т.е. $\sigma_a \sim \Delta P_c/\Delta P_a$.

По закону Пуазейля при ламинарном течении жидкости с вязкостью η в трубке кругового сечения длиной L и диаметром d на его концах создается перепад давления ΔP , равный:

$$\Delta P = 128 \frac{\eta L}{\pi d^4} Q, \quad \text{или} \quad \Delta P = Q \times R,$$

где $R = 128 \frac{\eta L}{\pi d^4}$ — гидравлическое сопротивление участка сосуда. Видно, что R обратно пропорционально четвертой степени диаметра сосуда. А так как проводимость σ есть величина, обратная сопротивлению, то она прямо пропорциональна четвертой степени диаметра. Таким образом, даже незначительное увеличение диаметра артерии должно приводить к заметному увеличению ее гидравлической проводимости, что и обеспечивает высокую чувствительность использованного метода.

Поскольку артерия и жесткая трубка соединены последовательно (рис. 1б), через них проходит один и тот же поток Q . В этом случае отношение падений давления на этих участках равно отношению их проводимостей: $\Delta P_c/\Delta P_a = \sigma_a/\sigma_c$. Так как

проводимость жесткой трубки σ_c — величина постоянная, то для оценки гидравлической проводимости сосуда σ_a достаточно измерить и вычислить отношение перепадов давлений.

Таким образом, разработанная нами методика позволяла измерять проводимость (или гидравлическое сопротивление) протяженного участка артерии крыс, сохраняя саму артерию интактной.

Разность давлений на входе и выходе из подвздошной артерии ΔP_a и на концах жесткой трубки ΔP_c регистрировали с помощью двух прецизионных дифференциальных манометров APZ 3020 (ООО Пьезус, Россия). Для регистрации системного давления ВР (рис. 1а) использовали электроманометр Statham P23AA (Gould Instruments, США). Сигналы от датчиков подавали на входы АЦП NI USB-6009 (National Instruments, США) и записывали в компьютер с частотой оцифровки 1 кГц. Перед обработкой их сначала усредняли за 2-секундный интервал. На мониторе отображались величины проводимости $\sim \Delta P_c/\Delta P_a$, кровотока в артерии $\sim \Delta P_c$ и среднего артериального давления ВР. Запись и обработку сигналов с выводом исследуемых

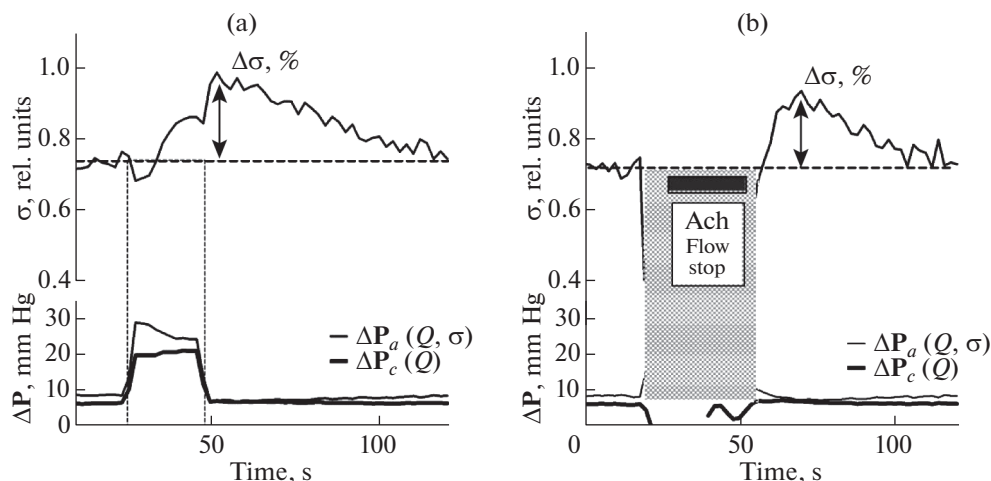


Рис. 2. Динамика изменений проводимости подвздошной артерии крысы в ответ на ступенчатое увеличение кровотока (a) и на введение ACh в артерию (b). Величину изменения проводимости $\Delta\sigma$ оценивали в процентах к уровню проводимости до начала воздействия. Проводимость артерии σ определяли как отношение $\Delta P_c/\Delta P_a$. Во время введения ACh сигналы ΔP_c и ΔP_a не регистрировали, поскольку кровоток во внешнем контуре был перекрыт.

параметров на экран монитора производили, используя собственное программное обеспечение, разработанное в среде LabView.

Порядок осуществления опытов. После завершения хирургической процедуры к сосудам подключали перфузионный контур и начинали перфузию, устанавливая с помощью винтового зажима кровоток в артерии на уровне 1.5–2.0 мл/мин. После 20-минутной стабилизации регистрировали ответ артерии на ступенчатое увеличение кровотока (в 2–4 раза). Для этого открывали трубку, шунтирующую сопротивление, задаваемое винтовым зажимом (рис. 1a). Увеличенный кровоток удерживали в течение 20–30 с — до тех пор, пока кривая проводимости не стабилизировалась на новом, более высоком, чем фоновый, уровне. Далее трубку пережимали, возвращая кровоток в артерии к исходному уровню. Воздействие с увеличенным кровотоком повторяли как минимум дважды. Далее дважды вызывали расширение подвздошной артерии, вводя внутриартериально ацетилхолин хлорид (ACh) (Sigma, США). Для этого на 30 с перекрывали кровоток на входе в перфузируемый контур и через тройник ретроградно в артерию медленно (в течение 20 с) вручную вводили 0.5 мл ACh в концентрации 10^{-6} – 10^{-5} M.

По окончании этого периода опыта, служившего контролем, в артерию вводили один из альдегидов: DGA (25 mM), MDA (12–18 mM) или MG (30–60 mM), пытаясь повредить эндотелий-зависимые реакции подвздошной артерии. Раствор DGA готовили из водного раствора глутарового альдегида (GA, 25%, Sigma-Aldrich, США), как описано в работе [9]. Раствор MG получали из готового 40%-ного водного раствора MG (Sigma-Aldrich, США).

MDA получали методом кислотного гидролиза из 1,1,3,3-тетраэтоксипропана [13], его концентрацию определяли при разбавлении 1:1000 по оптической плотности при 267 нм на спектрофотометре Hitachi 220A (Hitachi Inc., Япония), используя коэффициент экстинкции 31800 л/(моль см). Все альдегиды доводили до необходимой концентрации, добавляя раствор Рингера (в mM: NaCl 154; KCl 5.6; CaCl_2 2.2; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1). Кислотность растворов альдегидов доводили до pH 7.3–7.8, добавляя NaOH. Альдегиды вводили тем же путем, что и ACh, с помощью инъектора Sage 341A (Sage Instruments, США). Время введения DGA составляло 1 мин, а MDA и MG 7–10 мин. Спустя 30–60 мин повторяли те же реакции, которые осуществляли в контрольном периоде опыта.

Обработка результатов опытов. Эффекты альдегидов на опосредуемые эндотелием реакции артерий, вызываемые механическим (повышение кровотока) и фармакологическим (ACh) стимулами (показаны на рис. 2), оценивали, сравнивая величины реакций до и после введения альдегидов в русло сосуда. Величину реакций, регистрируемых в контрольном периоде опыта, принимали за 100%, а реакции после введения MDA, DGA и MG оценивали в % к величинам соответствующих реакций в контроле для каждого опыта и затем усредняли. Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего ($M \pm m$). Статистическую достоверность различий определяли, используя непараметрические критерии Манна–Уитни для непарных и Вилкоксона для парных сравнений с уровнем значимости $p < 0.05$. Построение графиков и статистический анализ осуществляли, используя пакет программ GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2а показана типичная запись изменения во времени проводимости подвздошной артерии крысы в ответ на ступенчатое увеличение кровотока. Величина перепада давления на жесткой трубке ΔP_c (жирная линия на нижнем графике) отражает изменение кровотока Q в артерии. (Скорости кровотока 1 мл/мин соответствует величина $\Delta P_c \approx 4$ мм рт.ст.). При открывании шунта, естественно, происходило увеличение кровотока как в артерии, так и во всей перфузионной системе, о чем свидетельствовало резкое увеличение как сигнала ΔP_c , так и сигнала ΔP_a .

Перепад давления на артерии ΔP_a тоже сначала быстро рос, достигая максимума, но, задержавшись на нем всего на несколько секунд, начинал плавно уменьшаться, что свидетельствовало об увеличении проводимости артерии. Из верхней записи на рис. 2а видно, что немедленно вслед за увеличением кровотока в артерии ее проводимость несколько уменьшалась. Это объясняется тем, что, согласно законам гидродинамики, при увеличении кровотока во всей магистрали трансмуральное давление в артерии несколько уменьшается, а это, в свою очередь, приводит к пассивному уменьшению диаметра сосуда, а значит и к уменьшению проводимости. Однако это уменьшение проводимости непродолжительно. И спустя 5–7 с после повышения кровотока проводимость подвздошной артерии начинает увеличиваться, что свидетельствует о ее расширении. Это расширение происходит, несмотря на снизившееся растягивающее давление. Особенно отчетливо увеличение проводимости артерии проявляется после восстановления исходного кровотока, когда происходит восстановление первоначального трансмурального давления. Поскольку гидродинамически состояния сосуда до увеличения и сразу после восстановления кровотока были одинаковы (одинаковые растягивающее давление и кровоток), именно эти моменты в наибольшей степени пригодны для оценки степени расширения подвздошной артерии. Кровоток при полном открывании шунта увеличивался в среднем в 3.0 ± 0.2 раза ($n = 18$), что вызывало увеличение проводимости подвздошной артерии на $43 \pm 6\%$. Поскольку для нас имели значение только изменения проводимости, вызываемые альдегидами, а не абсолютные величины реакции артерии, то далее на всех графиках величины кровотока Q и проводимости σ приводятся в относительных единицах.

На рис. 2б показана реакция той же артерии в ответ на введение в ее русло ACh. Так как кровоток на время введения был пережат, условия измерения величин ΔP_c и ΔP_a полностью нарушались, этот период исключали из рассмотрения (закрашен серым). Однако сразу после возобновления кровотока можно видеть характерную динамику увеличе-

ния проводимости, аналогичную той, что наблюдали в ответ на механический стимул.

Следует подчеркнуть, что анализу подвергали данные только тех опытов, в которых увеличение проводимости подвздошной артерии в контроле в ответ на увеличение кровотока и введение ACh составляло не менее 15%. Только в таких опытах исследовали затем действие альдегидов.

На начальном этапе этой работы в трех опытах для подавления реакции на поток мы использовали DGA, для того чтобы убедиться в том, что результат, получаемый на крысах и при использовании другой методики, соответствует результату, ранее полученному на артериях кошки [9]. Мы выяснили, что вводимый в артерию DGA (25 мМ, 1 мин) также полностью подавляет дилататорные ответы на поток, оставляя практически неизменными реакции, вызываемые ACh (Записи не показаны.)

На рис. 3 представлен результат одного из опытов, в котором сопоставлены реакции подвздошной артерии на повышение кровотока и ACh до и после введения в артериальное русло в течение 10 мин MDA (16 мМ). Как видно, в данном опыте MDA полностью устранил реакцию на увеличение потока, тогда как дилататорная реакция, вызванная ACh, при этом практически не изменилась.

В следующей серии опытов исследовали действие на сосуд другого эндогенного альдегида — MG. В 2 из 7 опытов наблюдался эффект, сходный с таковым при действии MDA: расширение, вызываемое повышением кровотока, уменьшалось весьма значительно, тогда как ответ на ACh оставался практически таким же, как в контроле. (Записи не показаны.)

Однако в остальных опытах с MG, выполненных по такому же протоколу, наблюдалось подавление реакций на оба стимула, как на механический, так и химический. Запись реакций одного такого опыта, в котором подавление обеих реакций проявилось достаточно полно, представлена на рис. 4. Слева показаны записанные в контроле значительные по величине реакции на ступеньку кровотока и на ACh, а справа — значительное подавление обоих ответов артерии, наблюдавшееся спустя 60 мин после воздействия MG (30 мМ, 10 мин). Важно отметить, что в течение этих 60 мин реакции и на увеличение кровотока, и на ACh уменьшались постепенно, становясь в конце опыта малозаметными.

Данные сравнения относительных величин реакций до и после применения каждого из альдегидов по всем опытам собраны в табл. 1 и, кроме того, представлены в виде суммарных графиков на рис. 5.

На графиках а, б и в (рис. 5) величины реакций в контроле (столбики С) приняты за 100%. Столбики рядом показывают среднюю ($M \pm m$) величину реакции ($\Delta\sigma$) после введения в русло артерии MDA,

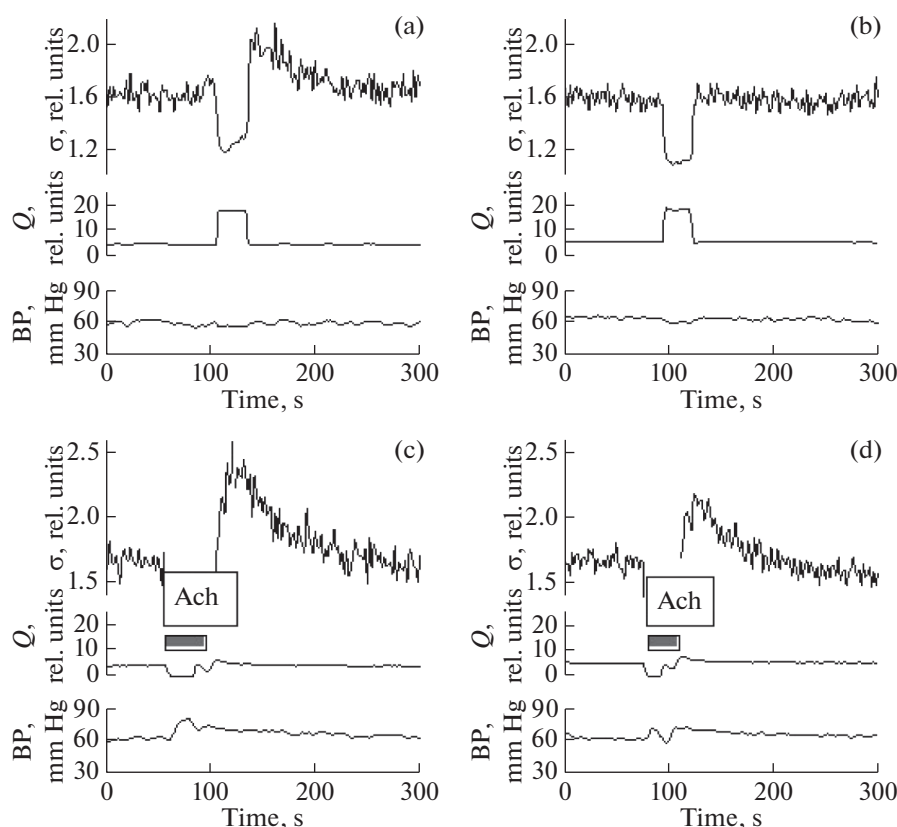


Рис. 3. Влияние MDA на эндотелий-зависимые реакции подвздошной артерии крысы на увеличение кровотока (a, b) и на ACh (c, d).

(a, c) — контроль до, (b, d) — через 30 мин после введения MDA в русло артерии.

DGA и MG (в % к величине $\Delta\sigma$ в контроле). Светлые столбики соответствуют реакциям на поток, темные — на ACh. Значимость отличий определяли по критерию Манна-Уитни, сравнивая величины реакций $\Delta\sigma$, полученных в 7 опытах до и после введения соответствующего альдегида.

Представленные в табл. 1 и на рис. 5 результаты опытов показывают, что эффект избирательного действия MDA на механочувствительное звено эндотелий-зависимой реакции сосуда является статистически значимым ($p < 0.01$) и сильно выраженным — амплитуда остаточных реакций в среднем составила $10 \pm 4\%$ исходной величины (график (a)). При этом амплитуда реакций на ACh в среднем не уменьшилась (недостаточное увеличение на $26 \pm 27\%$, $p = 0.4$). Аналогичное действие оказывал и DGA (график (b)): амплитуда остаточных реакций на увеличение кровотока в среднем составила $13 \pm 4\%$ исходной величины, а на ACh незначимо уменьшилась — на $13 \pm 15\%$ ($p = 0.4$).

Усредненные данные по всем 7 опытам с применением MG (рис. 5c) на первый взгляд не позволяют говорить о его избирательном действии в отношении механочувствительного компонента реак-

ций эндотелия. Действительно, MG достоверно подавлял обе реакции: и на увеличение потока ($Q\uparrow$, $p < 0.001$) и на ACh ($p < 0.05$). Однако можно заметить, что оставшаяся после воздействия MG реакция на ACh ($38 \pm 17\%$) значительно больше остаточной реакции на поток ($14 \pm 6\%$). Чтобы убедиться в достоверности этих отличий, мы определили для каждого из 7 опытов отношение амплитуд ($\Delta\sigma$) реакций на повышение кровотока ($Q\uparrow$) и на ACh и сравнили величины этого отношения в контроле и после введения MG. Результат показан на диаграмме (рис. 5d), отражающей изменение величин $(\Delta\sigma - Q\uparrow / \Delta\sigma - ACh)$ под действием MG для каждого из опытов.

На графике видно, что за единственным исключением все стрелки направлены вниз. Это означает, что во всех опытах, кроме одного, поток-зависимая дилатация артерии в результате действия MG уменьшалась сильнее, чем реакция на ACh. Статистический анализ показывает высокую достоверность различий в вызываемом MG ослаблении ответов на поток и на ACh ($p = 0.008$ по критерию Вилкоксона).

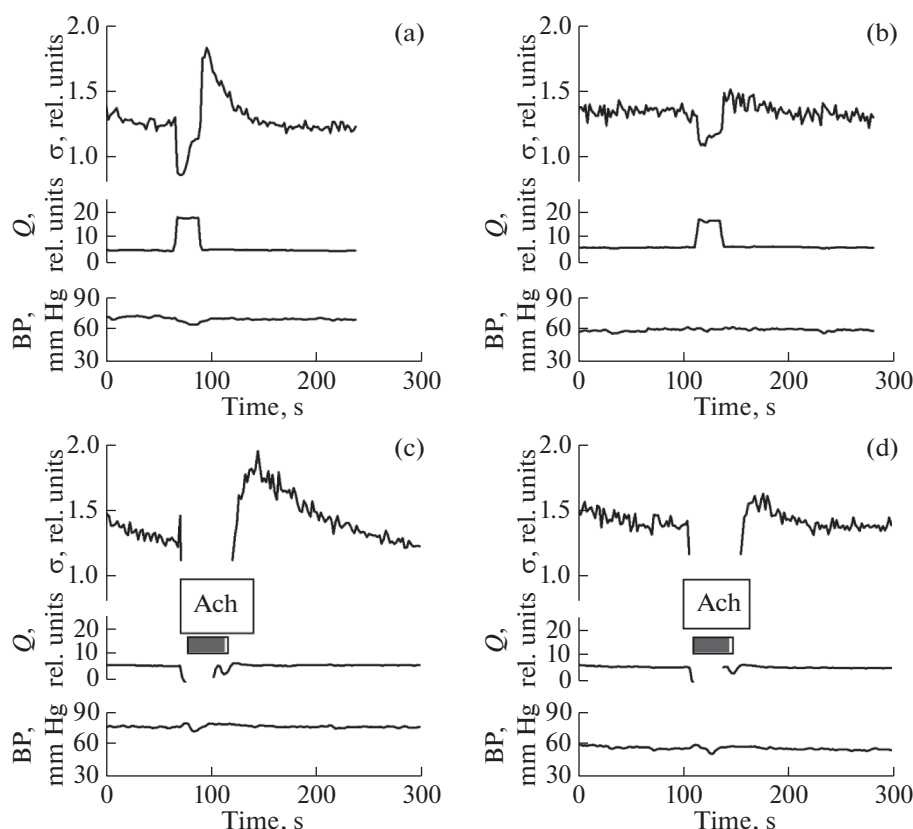


Рис. 4. Неизбирательное ингибирование MG опосредуемой эндотелием реакции артерии на увеличение кровотока (a, b) и на ACh (c, d).

(a, c) — контроль до, (b, d) — через 60 мин после введения MG в русло артерии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Общепризнано, что в основе многих заболеваний сердечно-сосудистой системы лежит дисфункция сосудистого эндотелия. Среди заболеваний, вызывающих нарушение нормального функционирования эндотелия, наиболее распространенными являются атеросклероз и сахарный диабет. Развитие патологии эндотелия на ранних этапах этих заболеваний связано с окислительным и карбонильным стрессами, когда при перекисном окислении липидов образуются дикарбонилы, повреждающие клетки эндотелия и подавляющие их способность выполнять свои функции [14].

Одной из основных функций сосудистого эндотелия является его способность реагировать на изменения действующего на стенку со стороны текущей крови напряжения сдвига, благодаря чему происходит приспособление гидравлического сопротивления сосудов к скорости кровотока в них [2]. Однако исследования последних двух десятилетий показали, что возникновению дисфункции эндотелия предшествует повреждение эндотелиального гликокаликса, слоя макромолекул, обращенных в просвет сосуда и производимых эндотелиоцитами. Это “покрытие” эндотелиальных кле-

ток, по структуре напоминающее “кустарник”, состоит из заякоренных в плазмалемме гликозаминогликанов, протеогликанов, гликопротеинов и гликолипидов [5, 15]. Гликокаликс защищает эндотелиальные клетки от повреждающих воздействий, а его повреждение приводит к увеличению проницаемости сосудистой стенки, к быстрому прогрессированию атеросклеротического процесса и к утрате способности регулировать тонус сосудистых гладких мышц при изменениях действующего на стенку напряжения сдвига [15].

В многочисленных исследованиях показано, что основным фактором, вызывающим повреждение гликокаликса и нарушение функции эндотелия при атеросклерозе и сахарном диабете, является окислительный стресс [16–19], при котором в избытке производятся активные формы кислорода, индуцирующие окисление таких субстратов, как липиды и углеводы. В процессе этого свободнорадикального окисления образуются вторичные продукты карбонильной природы, причем в процессе окисления ненасыщенных липидов образуется, главным образом, MDA, а в процессе окисления углеводов образуются гомологи MDA — глиоксаль и MG [19, 20]. Заметим, что все эти соединения

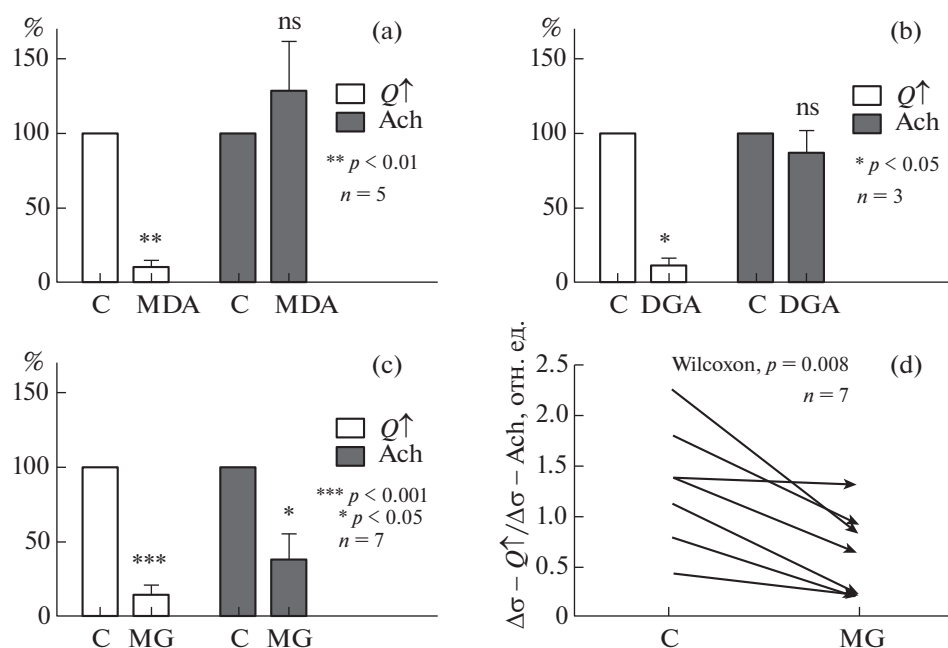


Рис. 5. Влияние MDA (a), DGA (b) и MG (c) на величину реакций подвздошной артерии крысы на ступенчатое увеличение кровотока ($Q\uparrow$, светлые столбики) и ACh (темные столбики). Величина реакций в контроле принята за 100%. Величины столбиков, соответствующих введениям MDA, DGA и MG характеризуют средние величины реакций, измеренные в % к исходным в каждом опыте. (d) — изменение под действием MG, отношения величин реакции на поток ($Q\uparrow$) к реакции на ACh. Стрелки указывают направление и величину изменений в каждом опыте. Начальная точка С соответствует отношению величин реакций в контроле до введения MG.

являются структурными аналогами глутарового альдегида.

Ранее в опытах на циркуляторно изолированных магистральных артериях кошек мы показали, что DGA избирательно повреждает способность эндотелия регулировать просвет сосудов при изменениях скорости кровотока [9]. Естественно было предполагать, что и образующиеся в процессе оксидативного и карбонильного стресса продукты перекисного окисления липидов — MDA и MG — также способны вызывать дисфункцию эндотелия, лишая его способности регулировать гидравлическое сопротивление сосудов при изменениях действующего на стенку напряжения сдвига.

Опыты, результаты которых приведены в этой статье, подтвердили сделанное предположение. Используя метод резистографии, что позволило регистрировать изменения гидравлического сопротивления интактной подвздошной артерии крыс, вызываемые повышением в ней кровотока и ACh, мы показали, что MDA подавляет дилаторные ответы на повышение напряжения сдвига, практически не влияя на расширение артерии, вызываемое ACh (рис. 3 и 5). Из этого следует, что MDA, так же как и димер глутарового альдегида, способен селективно повреждать механорецептор эндотелиоцитов, каковым является слой эндотелиального гликокаликса [4, 6–8], не затрагивая при этом способность клеток эндотелия расслаблять

гладкие мышцы при действии фармакологических дилаторов.

Менее определенный результат был получен в опытах, в которых на сосудистую стенку воздействовали MG. С одной стороны, действие этого

Таблица 1. Величины реакций подвздошной артерии крыс ($\Delta\sigma$) в ответ на увеличение кровотока и введение вазодилатора ACh до и после инфузии DGA, MDA или MG в русло артерии (в % от контроля)

Контроль		DGA		MDA		MG	
$Q\uparrow$	ACh	$Q\uparrow$	ACh	$Q\uparrow$	ACh	$Q\uparrow$	ACh
100.0	100.0	9.3	57.2	4.5	74.1	0.7	0.0
100.0	100.0	9.6	103.1	1.6	90.6	4.8	5.1
100.0	100.0	20.3	102.0	20.1	94.1	5.0	10.0
100.0	100.0	—	—	21.3	152.5	13.9	30.6
100.0	100.0	—	—	3.8	220.7	4.7	22.5
100.0	100.0	—	—	—	—	44.0	87.2
100.0	100.0	—	—	—	—	26.9	113.1
<i>M ± SEM</i>							
100.0	100.0	13.1	87.4	10.3	126.4	14.3	38.3
±0.0	±0.0	±3.6	±15.1	±4.3	±27.1	±6.0	±16.7

$Q\uparrow$ — реакция на увеличение кровотока flow, ACh — на введение вазодилатора.

альдегида было сходно с действием DGA и MDA: дилатация, вызываемая механическим стимулом (повышением скорости кровотока), подавлялась в большей степени, чем расширение, вызываемое Ach (рис. 4 и 5). Однако и расширение, вызываемое фармакологическим стимулом, подавлялось весьма существенно. Такой результат заставляет полагать, что либо MG, в отличие от MDA, взаимодействует также с мембранными белками хеморецепторов, включая холинорецептор, что и определяет ослабление ответа на Ach, либо MG не только изменяет жесткость гликокаликса и эндотелиоцитов, но также повреждает и внутриклеточный механизм, приводящий к высвобождению оксида азота или других факторов, расслабляющих гладкие мышцы.

Сравнение действия этих двух альдегидов, имеющих близкие молекулярные массы и являющихся изомерами, позволяет, хотя и с большой осторожностью, высказать предположение о том, что сахарный диабет должен быстрее, чем атеросклероз, приводить к серьезным нарушениям функционирования сердечно-сосудистой системы. Такое предположение уже высказывалось [21] на основе сравнения результатов свободнорадикального окисления липопротеидов низкой плотности глюкозой и MG. В пользу этого предположения свидетельствуют также полученные нами данные, выявившие некоторые различия в действии MG и MDA на эндотелий-зависимые реакции магистральной артерии крыс, что, как мы полагаем, связано с их различной проникающей способностью и с преимущественным действием одного из них извне на мембрану эндотелиоцитов и защищающий их слой гликокаликса, а другого — и на внутриклеточный биохимический механизм, который обеспечивает, в конечном итоге, расслабление гладких мышц. Поднятые вопросы, очевидно, весьма важны и нуждаются в дальнейшем исследовании.

Подводя итог, можно сказать, что альдегиды, образующиеся при свободнорадикальном окислении липидов и углеводов — MDA и MG, в целом действуют на сосудистый эндотелий сходным образом: они повышают жесткость гликокаликса и/или эндотелиоцитов, подавляя, таким образом, дилататорную реакцию, вызываемую механическим стимулом — повышением кровотока. При этом степень селективности такого подавления выше у MDA, это позволяет предполагать, что образующийся в избытке при гипергликемии MG, нарушая способность эндотелиоцитов расслаблять гладкие мышцы при действии на стенку сосуда не только механического, но и фармакологических стимулов, вызывает более серьезную, чем MDA, дисфункцию эндотелия.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-

00213) и в рамках Госзадания МЗ РФ (№ АААА-А18-118022290079-7).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и постановка задачи (А.М.М.), создание и разработка методики, планирование эксперимента (В.В.Е. и А.М.М.), разработка и введение в действие системы автоматической регистрации результатов и их первичной обработки (Е.В.Л.), постановка опытов и первичная обработка данных (В.В.Е.), анализ результатов, написание и редактирование манускрипта (В.В.Е. и А.М.М.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою искреннюю признательность профессору В.З. Ланкину и Г.Г. Коноваловой за дружескую помощь, без которой нам было бы трудно осуществить это исследование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Melkumyants A.M., Balashov S.A., Khayutin V.M.* (1989) Endothelium-dependent control of arterial diameter by blood viscosity. *Cardiovasc Res* 23 (9): 741–747. <https://doi.org/10.1093/cvr/23.9.741>
2. *Мелькумянц А.М., Балашов С.А.* (2005) Механочувствительность артериального эндотелия. М. Триада. [*Melkumyants A.M., Balashov S.A.* (2005) *Mechanochuvstvitel'nost' arterial'nogo endoteliya* [Mechanosensitivity of arterial endothelium]. Moscow. Triada. (in Russ)].
3. *Melkumyants A.M., Balashov S.A., Kartamyshev S.P.* (1994) Anticonstrictor effect of endothelium sensitivity to shear stress. *Pflug Arch* 427: 264–269. <https://doi.org/10.1007/BF00374533>
4. *Barakat A.I.* (2001) A model for shear stress-induced deformation of a flow sensor on the surface of vascular endothelial cells. *J Theor Biol* 210: 221–236. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2290>
5. *Weinbaum S., Zhang X., Han Y., Vink H., Cowin S.C.* (2003) Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7988–7995. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332808100>
6. *Pahakis M.Y., Kosky J.R., Tarbell J.M.* (2007) The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* 355 (1): 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.137>
7. *Florian J.A., Kosky J.A., Ainslie K., Pang Z., Dull R.O., Tarbell J.M.* (2003) Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res* 93: 136–

142.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000101744.47866.D5>
8. Мелькумянц А.М., Балашов С.А., Гончар И.В. (2017) Влияние повреждения эндотелиального гликокаликса на способность артерий регулировать свой просвет при изменениях скорости кровотока. *Рос физиол журн им. И.М. Сеченова*. 103 (12): 1370–1376. [Melkumyants A.M., Balashov S.A., Gonchar I.V. (2017) The influence of endothelial glycocalyx injury on the ability of arteries to control their lumen in accordance to changes in blood flow. *Russ J Physiol* 103 (12): 1370–1376. (In Russ)].
9. Mel'kumyants A.M., Balashov S.A., Smieshko V., Khayutin V.M. (1986) Selective blocking of arterial sensitivity to blood flow rate by glutaraldehyde. *Bull Exp Biol Med* 101: 568–570.
<https://doi.org/10.1007/BF00835862>
10. Мелькумянц А.М., Балашов С.А. (1999) Роль деформируемости эндотелиальных клеток в реакциях артерий на изменения напряжения сдвига. *Рос физиол журн им. И.М. Сеченова*. 85: 910–917. [Melkumyants A.M., Balashov S.A. (1999) The role of deformability of endothelial cells in the arterial response to shear stress. *Russ J Physiol* 85: 910–917. (In Russ)].
11. Kumskova E.M., Antonova O.A., Balashov S.A., Tikhaze A.K., Melkumyants A.M., Lankin V.Z. (2014) Malonyldialdehyde and glyoxal act differently on low-density lipoproteins and endotheliocytes. *Mol Cell Biochem* 396 (1–2): 79–85.
<https://doi.org/10.1007/s11010-014-2144-x>
12. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин Н.А. (2006) Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М. Слово. [Men'shikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar' I.A., Krugovykh N.F., Trufakin N.A. (2006) Oksidativnyi stress. Prooksidanty i antioksidanty [Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants]. Moscow. Slovo. (In Russ)].
13. Requena J.R., Fu M.X., Ahmed M.U., Jenkins A.J., Lyons T.J., Baynes J.W., Thorpe S.R. (1997) Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. *Biochem J* 322 (1): 317–325.
<https://doi.org/10.1042/bj3220317>
14. Lankin V.Z., Tikhaze A.K. (2003) Atherosclerosis as a free radical pathology and antioxidative therapy of this disease. In: Tomasi A., Ezben T., Skulachev V.P. (eds). *Free radicals, nitric oxide, and inflammation: molecular, biochemical, and clinical aspects*. IOS Press, NATO Science Series, Amsterdam 344: 218–231.
15. Мелькумянц А.М. (2012) О роли эндотелиального гликокаликса в механогенной регуляции сопротивления артериальных сосудов. *Успехи физиол наук*. 43 (4): 45–58. [Melkumyants A.M. (2012) About the role of endothelial glycocalyx in mechanogenic regulation of arterial vascular resistance. *Usp Fiziol Nauk* 43 (4): 45–58. (In Russ)].
16. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Kapel'ko V.I., Shepel'kova G.S., Shumaev K.B., Panasenkov O.M., Konovalova G.G., Belenkov Y.N. (2007) Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress. *Biochemistry (Mosc)* 72 (10): 1081–1090.
<https://doi.org/10.1134/S0006297907100069>
17. Steinberg D., Witztum J.L. (2010) Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30 (12): 2311–2316.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179697>
18. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Konovalova G.G., Kumskova E.M., Shumaev K.B. (2010) Aldehyde-dependent modification of low density lipoproteins. In: Rathboun J.E. (ed) *Handbook of lipoprotein research*. NOVA Sci Publish Inc, New York 85–107.
19. Lankin V.Z., Konovalova G.G., Tikhaze A.K., Nedosugova L.V. (2011) The influence of glucose on free radical peroxidation of low density lipoproteins in vitro and in vivo. *Biochemistry (Mosc.)*. Suppl. Series B: Biomedical Chemistry 5: 284–292.
<https://doi.org/10.1134/S1990750811030061>
20. Donato H. (1981) Lipid peroxidation, cross-linking reactions, and aging. In: Sohal R.S. (ed). *Age pigments*. Elsevier, Amsterdam 63–81.
21. Lankin V.Z., Konovalova G.G., Tikhaze A.K., Shumaev K.B., Kumskova E.M., Viigmaa M. (2014) The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes. *Mol Cell Biochem* 395 (1–2): 241–252.
<https://doi.org/10.1007/s11010-014-2131-2>

MALONDIALDEHYDE- AND METHYLGLYOXAL-INDUCED SUPPRESSION OF ENDOTHELIUM-DEPENDENT DILATION OF THE RAT ILIAC ARTERY IN RESPONSE TO ELEVATION IN BLOOD FLOW

V. V. Ermishkin^a, E. V. Lukoshkova^a, and A. M. Melkumyants^a

^a National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia

Arterial vessels dilate in response to an increase in blood flow. This regulation is based on the ability of endothelial cells to induce relaxation of vascular smooth muscle cells in response to a rise in wall shear stress. Previously, we demonstrated that dimeric glutaraldehyde (DGA) selectively inhibits endothelium-dependent flow-mediated vasodilation via reinforcing endothelial cell stiffness. The present study aims to find out whether the products of oxidative and carbonyl stress, malonyldialdehyde (MDA) and methylglyoxal (MG), are also able to selectively suppress endothelium-dependent flow-mediated dilation. In experiments on anesthetized rats, the changes in

vascular conductance of the intact iliac artery, induced by a stepwise flow rise, were studied under control and after infusion of MDA, MG, or DGA into the arterial bed. Simultaneously, a dilation of the artery in response to intra-arterial injection of ACh was tested before and after exposure of the artery to any of the above aldehydes in order to make sure that endothelium retains its ability to relax smooth muscles. Both MDA and DGA strongly and selectively suppressed the flow-mediated dilation of the iliac artery with virtually no effect on the response to ACh. MG suppressed both arterial responses, with a more profound effect exerted on the flow-mediated dilation and a much lesser effect on the response to ACh. These data suggest that aldehydes produced in the process of lipid peroxidation can lead to endothelial dysfunction. Since the endothelial glycocalyx is referred to as a potential mechanosensor that provides the transduction of wall shear stress into the endothelial cell response, the observed detrimental effects of the tested aldehydes on the ability of the iliac artery to tune its diameter in accordance with blood flow can result from the structural derangement of the endothelial glycocalyx.

Keywords: malonyldialdehyde, methylglyoxal, dimeric glutaraldehyde, endothelium-dependent dilation, mechanosensitivity of the endothelium, glycocalyx

ВЛИЯНИЕ ОБОГАЩЕННОЙ СРЕДЫ И СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НА УСЛОВНОРЕФЛЕКТОРНЫЙ СТРАХ У КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ РАННИЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

© 2021 г. И. В. Павлова^{1,*}, Н. Д. Брошевицкая¹

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

*e-mail: pavlovmf@mail.ru

Поступила в редакцию 20.01.2021 г.

После доработки 16.02.2021 г.

Принята к публикации 02.04.2021 г.

У крыс, подвергнутых раннему провоспалительному стрессу (введение липополисахарида (ЛПС) на 3-й и 5-й день после рождения в дозе 50 мкг/кг), исследовали влияние содержания в условиях социальной изоляции или обогащенной среды в возрасте с 1.5 до 4 мес на выработку и угашение условнорефлекторного страха. Тестирование через 24 ч после обучения показало, что после социальной изоляции у самцов и самок ухудшалась выработка условнорефлекторного страха, что проявилось в уменьшении времени замирания. Наибольшую чувствительность к социальной изоляции показали крысы с ранним провоспалительным стрессом, у которых снижалось время замирания как на сигнал, так и контекст. Предполагается, что уменьшение страха связано с дефицитом памяти. Обогащение среды снижало время замирания, но в меньшей степени, чем социальная изоляция, при этом уменьшался страх только на контекст. Угашение страха у самцов ЛПС-группы ускорялось после социальной изоляции и обогащения среды по сравнению с животными этой группы, содержащимися в стандартных условиях. Полученные результаты свидетельствуют, что после раннего провоспалительного стресса взрослые животные были более уязвимы к изменениям условий содержания.

Ключевые слова: социальная изоляция, обогащение среды, липополисахарид, ранний провоспалительный стресс, условнорефлекторный страх, угашение рефлекса

DOI: 10.31857/S0044452921040057

Известно, что вмешательства в нормальное развитие в раннем онтогенезе создают предрасположенность к появлению психопатологии, которая может проявиться при новом вмешательстве в дальнейшей жизни (“втором ударе”) [1–3]. У людей обнаружена тесная связь ранних негативных влияний с развитием целого ряда психоневрологических заболеваний, таких как депрессия, тревожные расстройства, посттравматический синдром, аутизм и др. [4, 5]. Выявлены существенные половые различия в частоте проявления этих заболеваний [6].

Базовой причиной для многих перечисленных расстройств является нейровоспаление, которое может возникать под влиянием раннего стресса [5]. В экспериментах на животных наиболее часто используется модель нейровоспаления, вызванная инъекцией бактериального липополисахарида (ЛПС). ЛПС является составным компонентом внешней части мембраны грамотрицательных бактерий, и его введение приводит к высвобождению большого числа эндогенных провоспалительных медиаторов

(цитокины, хемокины и др.) через TLR4*MD-2 комплекс [7].

В литературе имеются сведения о том, что ранний провоспалительный стресс может оказывать влияние на оборонительное поведение взрослых животных. Провоспалительный стресс мог приводить к ослаблению условнорефлекторного страха на контекст, проявляющегося в виде замирания [8–10], или, наоборот, увеличению его выражения у взрослых крыс-самцов после введения ЛПС в раннем онтогенезе [11, 12]. В других работах не было обнаружено влияния введения ЛПС на 14-й день от рождения на выработку условнорефлекторного страха на контекст или на сигнал у взрослых крыс, но наблюдался дефицит в угашении классического оборонительного рефлекса [13]. После провоспалительного стресса имелись нарушения при обучении в бассейне Морриса [14], в обучении распознаванию нового объекта [9, 10] и при выработке активного избегания [12, 15]. Проведенные нами ранее эксперименты [12] показали, что ранний провоспалительный стресс вызывал изменения в оборонительном поведении взрослых крыс,

которые зависели от пола животного. У самцов с ранним введением ЛПС условнорефлекторный страх на контекст после выработки классического оборонительного условного рефлекса и рефлекса пассивного избегания проявлялся в большей степени, а его угашение было затруднено по сравнению с контрольными животными. У самок с ранним введением ЛПС не наблюдалось значительных изменений в проявлении страха, однако угашение классического рефлекса облегчалось.

Возникает вопрос о том, как скажутся последствия раннего стресса на обучение взрослых животных при столкновении с различными дополнительными воздействиями, как негативными стрессорирующими, так и благоприятными. Можно ли ослабить последствия провоспалительного стресса путем содержания животных в особых условиях?

В экспериментах на животных широко используют такое стрессорирующее воздействие, как социальная изоляция. Начатая в раннем подростковом возрасте, социальная изоляция увеличивает тревожное и депрессивно-подобное поведение взрослых животных [16–20]. Кроме того, социальная изоляция приводит к нарушению когнитивных способностей у животных. У изолянтов возникали трудности при обучении поиску скрытой платформы в водном лабиринте [21–23]. У изолянтов была нарушена выработка условнорефлекторного страха, проявляющегося в виде замирания [21, 24, 25], и выработка условного рефлекса пассивного избегания [22]. В качестве причины нарушения обучения рассматривается дефицит памяти [21, 23, 26–29].

С другой стороны, обогащение среды обитания путем добавления в клетку различных предметов для лазанья, игры, зарывания, физических упражнений оказывает положительное действие, уменьшает тревожное и депрессивно-подобное поведение [18, 30–32]. Обогащение среды приводило к более быстрому обучению мышей в пространственных задачах в водном лабиринте [21, 33]. Обогащение среды у самок мышей замедляло угашение условнорефлекторного страха в виде замирания на звук [33]. Обогащение среды могло не влиять на условнорефлекторное замирание при классическом оборонительном рефлексе и на рефлекс активного избегания [34] или, наоборот, усиливать замирание [25].

Можно было ожидать, что социальная изоляция и обогащение среды окажут разнонаправленное действие на оборонительное поведение животных. Предполагалось, что крысы группы ЛПС будут наиболее уязвимы к стрессорирующему воздействию, а содержание в обогащенной среде будет способно компенсировать негативное влияние раннего провоспалительного стресса. Целью нашей работы было исследовать влияние социальной изоляции и обогащения среды на условнорефлекторный страх у крыс в норме и после раннего провоспалительного

стресса. В задачу работы входила, во-первых, подготовка экспериментальных групп животных, которая включала введение бактериального липополисахарида (группа ЛПС, 50 мкг/кг), либо физиологического раствора (группа ФИЗ, контроль) крысам на 3-й и 5-й день от рождения и содержания животных с 1.5 до 4 мес в различных условиях (социальная изоляция, обогащение среды, стандартные условия). Во-вторых, необходимо было сопоставить выработку, проявление и угашение условнорефлекторного страха на звук у взрослых животных при разных условиях содержания в группах ФИЗ и ЛПС. В-третьих, необходимо было сопоставить влияние раннего провоспалительного стресса и разных условий содержания на самцов и самок.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В опытах было использовано 143 крысы линии Вистар в возрасте от 3.5 до 4 мес (76 самцов и 67 самок). Крысята (15 пометов) были выведены в виварии Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН от родителей, полученных из филиала “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Россия. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

На 3-й и 5-й день от рождения у половины крысят из помета вызывали провоспалительный стресс путем введения ЛПС в дозе 50 мкг/кг в объеме 10 мкл/г (группа ЛПС, всего 65 крысят). Во время этой процедуры крысята отлучались от матери на 15–20 мин. Они взвешивались на электронных весах с точностью до 0.01 г и получали подкожную инъекцию ЛПС в холку с помощью инсулинового шприца. Крысята группы ЛПС дополнительно метились с помощью подкожного введения у основания хвоста 10 мкл черной краски, используемой для татуировок у людей. Другой группе крысят из помета в этом же возрасте подкожно вводили физиологический раствор в объеме 10 мкл/г (группа ФИЗ, контроль, всего 78 крысят). При разделении пометов старались уравнивать число самцов и самок в группах ЛПС и ФИЗ. Разделение пометов делалось с целью ослабить влияние генетического фактора на результаты экспериментов. В возрасте 25 дней крысят отлучали от матери и формировали клетки таким образом, что в одной клетке содержались крысы одного пола из 2–3 пометов из одной группы (либо ЛПС, либо ФИЗ). В дальнейшем животных содержали в виварии при обычном 12-часовом световом режиме в свободном доступе к воде и стандартному корму. В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63/EU) и положения Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН о работе с экспериментальными животными.

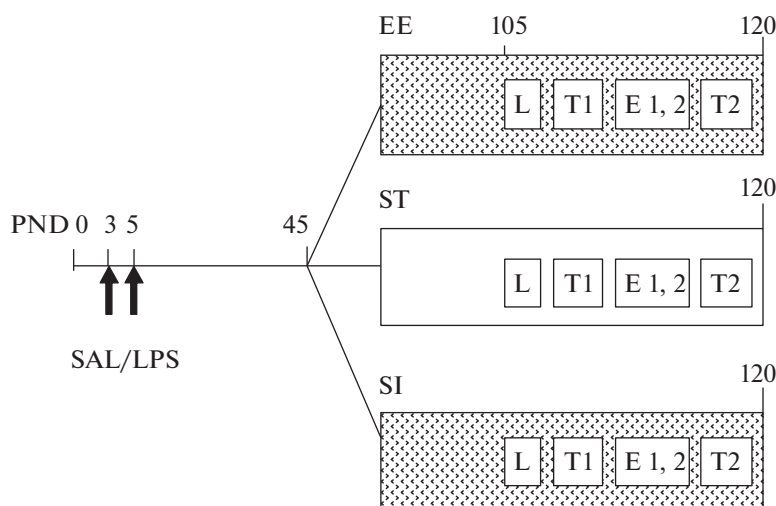


Рис. 1. Схема эксперимента и разделение крыс на группы. PND — постнатальные дни. SAL/LPS — введение физиологического раствора или ЛПС. EE — содержание в обогащенной среде, ST — в стандартных условиях содержания, SI — в социальной изоляции. L — обучение, T1 и T2 — тесты 1 и 2, E 1, 2 — угашение 1 и 2.

Создание различных условий содержания крыс.

В возрасте 45 дней каждую группу крыс делили на три группы в зависимости от условий содержания, которые оставались неизменными до конца экспериментов (до 4 мес, рис. 1). Одна группа крыс содержалась в стандартных условиях по 3–5 животных в клетке (группа СТАНД). Вторая группа помещалась в обогащенную среду (группа ОС), которая создавалась в коробке размером $51 \times 40.5 \times 30$ см, где находились лесенки, беличье колесо, материал для зарывания, трубки. Параллельно с исследованием обогащенной среды крысы проходили хендлинг. В обогащенную среду крыс помещали на 20 мин через день. Третья группа крыс подвергалась социальной изоляции (группа СИ). При социальной изоляции крысы содержались поодиночке в клетках размером $30 \times 30 \times 17.5$ см. Таким образом, в работе анализировали поведение 6 групп крыс: ФИЗ + СТАНД (46 крыс), ЛПС + СТАНД (34 крысы), ФИЗ + ОС (18 крыс), ЛПС + ОС (16 крыс), ФИЗ + СИ (14 крыс), ЛПС + СИ (15 крыс).

Выработка, тестирование и угашение классического условного оборонительного рефлекса (fear conditioning). Для выработки классического павловского условного оборонительного рефлекса использовали камеру Startle and Fear Combined System производства PanLab Harvard apparatus (Испания, 2000). Эксперименты начинали у крыс в возрасте 3.5 мес (рис. 1). При обучении после 120-секундного периода обследования камеры животным давали 3 сочетания звука (30 с, 80 дБ, 2000 Гц) и электрокожного болевого раздражения (2 с, 0.8 мА, задержка 28 с от начала действия звука) с 40–50-секундными межсигнальными интервалами, после чего следовал период последствий в 40 с. Затем через 24 ч после

обучения проводили тестирование условнорефлекторного страха (тест 1), который оценивали по времени замирания. При тестировании животных помещали в тот же контекст на 120 с, после чего предъявляли звук в течение 120 с (80 дБ, 2000 Гц), далее следовал период последствий в 120 с. Далее в двух опытах проводили угашение условнорефлекторного страха, при этом давали по 10 изолированных звуковых стимулов (30 с, 80 дБ, 2000 Гц) без электрокожных раздражений с 20-секундными межсигнальными интервалами. После процедуры угашения тестировали сохранность рефлекса (тест 2).

Во всех опытах поведение крыс анализировали до (реакции на контекст), во время (на контекст и сигнальный раздражитель) и после действия звука (последствия). Замирание — периоды неподвижности длительностью не менее 2 с, когда можно наблюдать только дыхательные движения животного. Замирание определяли по записи механограммы пола камеры с помощью амплитудного и временного порогов. Амплитудный порог зависел от массы тела крысы, коэффициента усиления и выставлялся таким образом, чтобы отсечь интервалы с активным движением животного. Обработка проводилась с помощью стандартной программы, прилагающейся к установке фирмы Panlab. Программа позволяла детектировать эпизоды замирания, определять их длительность и рассчитывать процент времени замирания от времени регистрации. Кроме того, для оценки уровня эмоционального напряжения у крыс подсчитывали число дефекаций и уринаций.

Статистическая обработка данных. Для вторичной обработки результатов использовали стандартную программу STATISTICA 8.0. Распределение исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смир-

нова (Basic Statistics, раздел Descriptive Statistics). Если анализируемый параметр удовлетворял данному критерию, то при сравнении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, раздел factorial ANOVA. При *post-hoc* анализе применяли критерий Newman–Keuls test. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$, отмечали наличие тенденции при $0.05 < p < 0.1$. Во всех экспериментах анализировали влияние факторов ПОЛ, ГРУППА, УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ, в некоторых случаях также анализировали влияние фактора ИНТЕРВАЛ ВРЕМЕНИ. При отсутствии нормальности распределения поведенческих параметров использовали Kruskal–Wallis test, с последующим сравнением групп с помощью Multiple Comparisons (Nonparametric Statistics), а также Mann Whitney U test. Данные на рисунках представлены в виде средних значений $\pm$ ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние различных условий содержания на выработку условнорефлекторного страха. Анализ с помощью Factorial ANOVA динамики обучения крыс выявил влияние факторов ИНТЕРВАЛ ВРЕМЕНИ ($F_{6,914} = 171.6$, $p = 0.000$), УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ ($F_{2,914} = 171.6$, $p = 0.000$), ПОЛ ($F_{1,914} = 4.3$, $p = 0.038$), а также взаимодействие факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ $\times$ ПОЛ ($F_{2,914} = 11.0$, $p = 0.000$). Учитывая наличие такого взаимодействия, в дальнейшем рассматривали отдельно влияние условий содержания на крыс разного пола. Post hoc анализ показал (рис. 2а), что у самцов обогащение среды приводило в целом к большему ($p < 0.05$) времени замирания как в группе ФИЗ + ОС, так и ЛПС + ОС по сравнению с группами ФИЗ + СТАНД и ЛПС + СТАНД соответственно. Наибольшие различия наблюдались после ОС при действии 2-го звука, т.е. крысы группы ФИЗ + ОС и ЛПС + ОС быстрее обучились и замирали больше уже после первого сочетания звука с болевым раздражением. Социальная изоляция не оказывала влияния на время замирания у самцов. У самок, наоборот, социальная изоляция приводила к уменьшению в целом времени замирания в группах ФИЗ + СИ и ЛПС + СИ по сравнению с группами ФИЗ + СТАНД и ЛПС + СТАНД соответственно. Статистически значимые различия наблюдались только в отдельных интервалах времени (рис. 2б). Кроме того, у самок группы ЛПС обогащение среды оказывало такое же влияние, как социальная изоляция, вызывая уменьшение времени замирания в группе ЛПС + ОС по сравнению с группой ЛПС + СТАНД. Обогащение среды приводило к снижению числа уриаций по сравнению со стандартными условиями содержания (рис. 2с) (Kruskal–Wallis test $H(2, n = 170) = 14.79$, $p = 0.001$, Multiple Comparisons, $p = 0.008$) и по сравнению с социальной изоляцией (Multiple Comparisons, $p = 0.002$).

Таким образом, социальная изоляция затрудняла обучение у самок, а обогащение среды, наоборот, ускоряло обучение у самцов.

Влияние различных условий содержания на проявление условнорефлекторного страха в тесте 1. На процент времени замирания в тесте 1 оказывали влияние факторы ИНТЕРВАЛ ВРЕМЕНИ ($F_{2,393} = 97.29$, $p = 0.000$), УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ ($F_{2,393} = 5.46$, $p = 0.000$), ГРУППА ($F_{1,393} = 3.96$, $p = 0.047$), ПОЛ ($F_{1,393} = 4.01$, $p = 0.046$), также наблюдалось взаимодействие факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ $\times$ ГРУППА $\times$ ПОЛ ($F_{2,393} = 3.11$, $p = 0.046$). Post hoc анализ в целом по всему тесту показал (рис. 3а), что в группах как ФИЗ, так и ОС или СИ приводила к уменьшению времени замирания по сравнению с животными в стандартных условиях, причем после социальной изоляции снижение было более выраженным у самцов в группах ФИЗ и ЛПС, а также у самок в группе ЛПС. Подробный анализ по интервалам времени (рис. 3б, с), показал, что ОС по сравнению со стандартными условиями приводила к статистически значимому снижению времени замирания только в интервале до (самцы группы ЛПС) или после действия звука (самки группы ФИЗ), т.е. при исследовании контекста. СИ у групп ЛПС вызывала существенные изменения, происходило снижение времени замирания как при действии звука, так и в интервалах до и после действия (рис. 3б, с). СИ у групп ФИЗ вызывала меньшие изменения, в основном в интервале после действия звука.

Изменение условий содержания не влияло на число дефекаций (рис. 3е, Kruskal–Wallis test $H(2, n = 170) = 2.96$, $p = 0.227$). Число уриаций увеличивалось у крыс после СИ по сравнению с ОС (рис. 3д, Kruskal–Wallis test $H(2, n = 170) = 12.09$, $p = 0.002$, Multiple Comparisons, $p = 0.004$) и по сравнению со стандартными условиями (на уровне тенденции, Multiple Comparisons, $p = 0.065$). Это свидетельствовало о том, что СИ увеличивала вегетативную реактивность.

Таким образом, тест 1 показал, что после СИ крысы хуже выработали условнорефлекторный страх, проявляющийся в виде замирания. Наибольшую чувствительность к СИ показали крысы с ранним провоспалительным стрессом, у которых уменьшилось проявление страха как на сигнал, так и на контекст. ОС также уменьшало проявление страха в виде замирания, но в меньшей степени, чем СИ, при этом уменьшался страх только на контекст.

Влияние различных условий содержания на угашение условнорефлекторного страха. После двух сеансов угашения был проведен тест 2, результаты которого представлены на рис. 4а. На процент времени замирания в тесте 2 оказывали влияние факторы ИНТЕРВАЛ ВРЕМЕНИ ($F_{2,39} = 19.25$, $p = 0.000$), УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ ($F_{2,393} = 26.94$, $p = 0.000$), ПОЛ ($F_{1,393} = 21.26$, $p = 0.000$), наблюда-

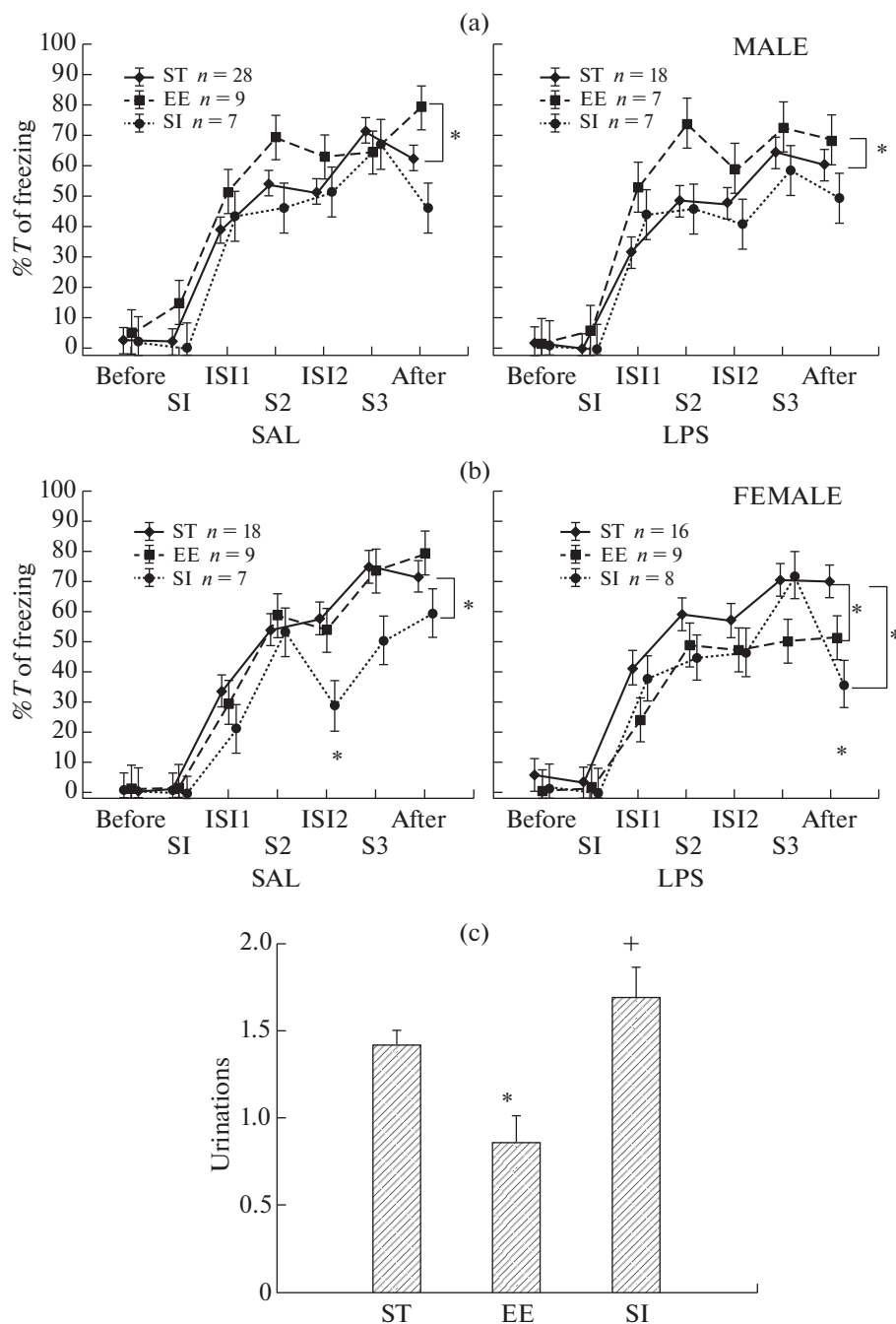


Рис. 2. Влияние различных условий содержания крыс на выработку условнорефлекторного страха. ST – группа крыс со стандартными условиями содержания, EE – группа крыс с обогащением среды, SI – группа крыс с социальной изоляцией. SAL – группа с введением физиологического раствора в раннем онтогенезе, LPS – группа с введением ЛПС. По оси абсцисс на (a) и (b) – интервалы времени (Before – до начала сочетаний, S1, S2, S3 – во время 1-го, 2-го, 3-го звука, ISI1, ISI2 – 1-й и 2-й межсигнальный интервал, After – после сочетаний), на (c) – группы крыс. По оси ординат – на (a) и (b) – процент времени замирания, на (c) – число уринаций. *n* – число крыс в группе. * – статистически значимые отличия в группе крыс, содержащейся в измененных условиях, по сравнению с группой в стандартных условиях ($p < 0.05$, на (a) и (b) – post hoc анализ, Factorial ANOVA, на (c) – Kruskal–Wallis test, Multiple comparison). + – различие между крысами, содержащимися в ОС и СИ.

лось взаимодействие факторов УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ $\times$ ПОЛ ($F_{2,393} = 4.92$, $p = 0.008$). Post hoc анализ показал (рис. 4a), что в целом по тесту

как в группе ФИЗ, так и в группе ЛПС самцы замирали значительно меньше после обогащения среды и социальной изоляции, чем самцы, содержащиеся

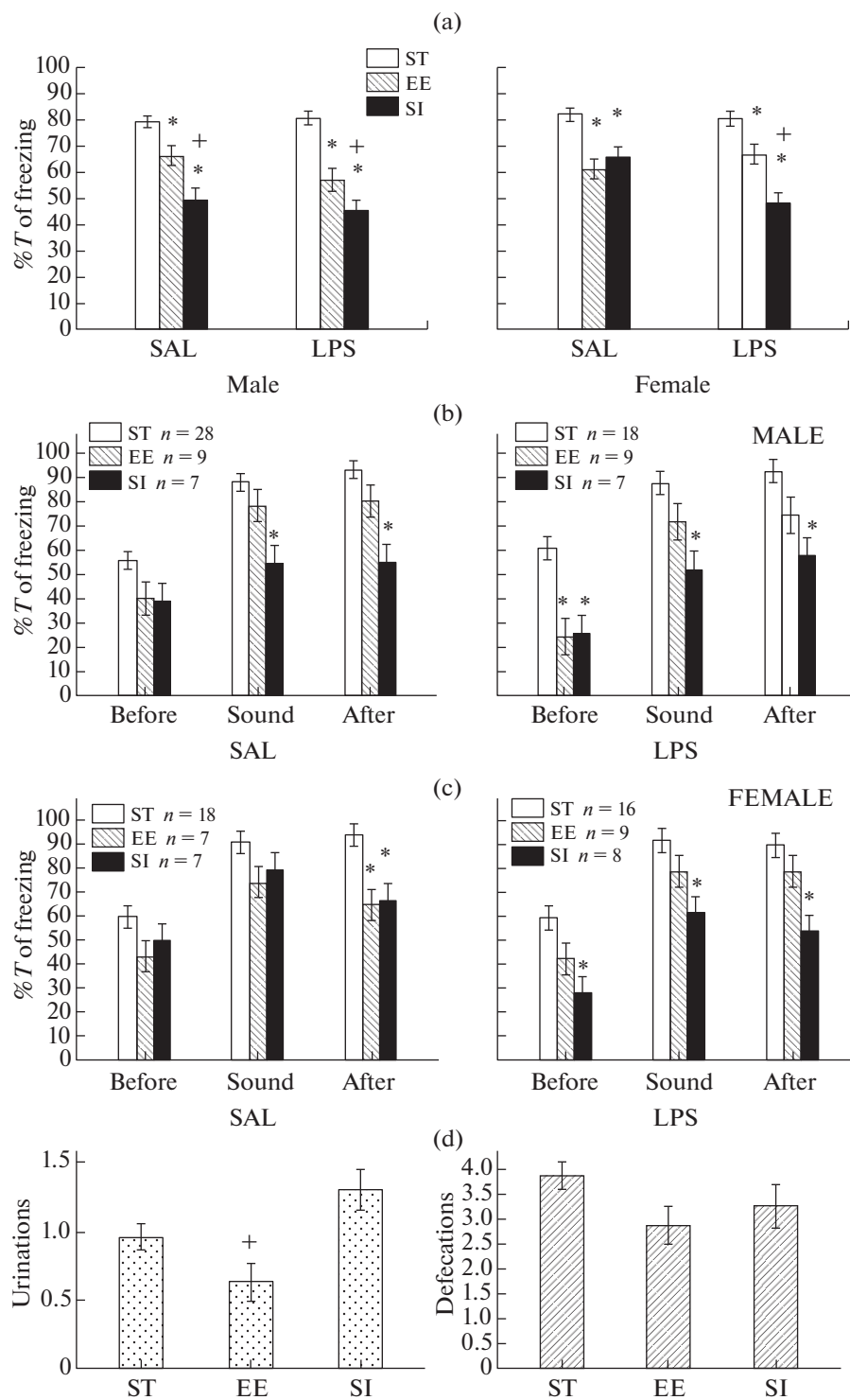


Рис. 3. Влияние различных условий содержания крыс на проявление условнорефлекторного страха в тесте 1. (a) – суммарные данные по времени замирания по всему тесту, (b) и (c) – по различным интервалам времени в тесте, (d) – число ури-
наций за опыт, E – число дефекаций. ST – группа крыс в стандартных условиях содержания, EE – группа крыс с обога-
щением среды, SI – группа крыс с социальной изоляцией. По оси абсцисс на (b) и (c) – различные интервалы вре-
мени, Before – до действия звука, Sound – во время, After – после звука. По оси ординат на (a–c) – процент времени
замирания, T – время. * – статистически значимые различия в EE или SI группе по сравнению с ST группой ($p < 0.05$, на
(a–c) – post hoc анализ, Factorial ANOVA, на (d) – Kruskal–Wallis test, Multiple comparison), + – различие между крысами,
содержащимися в EE и SI.

в стандартных условиях. У самок в стандартных условиях угашение было более эффективным, чем у самцов, что согласуется с данными, полученными ранее [12]. Обогащение среды и социальная изоляция у самок вызывали уменьшение времени замирания в тесте 2 по сравнению с животными в нормальных условиях, но менее выраженное, чем у самцов.

Таким образом, у крыс после социальной изоляции и обогащения среды условнорефлекторный страх угашался быстрее, чем у животных, содержащихся в стандартных условиях. Возникает вопрос, более быстрое угашение связано с тем, что замирание у этих крыс было изначально меньше по времени (данные по тесту 1), или социальная изоляция и обогащение среды влияли на сам процесс угашения? Для ответа на этот вопрос для каждой группы крыс сравнивали соотношение времени замирания в тесте 2 и тесте 1 по формуле $(T \text{ замирания в тесте 2}) / (T \text{ замирания в тесте 1}) \times 100\%$, результаты такого анализа представлены на рис. 3b–d. На такое соотношение времени замирания в разных тестах (рис. 4b) оказывали влияние фактор УСЛОВИЯ СОДЕРЖАНИЯ ($F_{2,393} = 7.93, p = 0.000$), ГРУППА ($F_{1,393} = 4.92, p = 0.027$) и ПОЛ ($F_{2,393} = 37.34, p = 0.000$).

Post hoc анализ показал, что у самок угашение рефлекса проходило быстрее, чем у самцов в стандартных условиях содержания. В группе ФИЗ у самцов и самок, а также в группе ЛПС у самок обогащение среды и социальная изоляция не оказывали влияния на угашение рефлекса по сравнению со стандартными условиями содержания (рис. 4b). У самцов в группе ЛПС угашение проходило быстрее после обогащения среды и социальной изоляции по сравнению со стандартными условиями содержания. Подробный анализ по интервалам (рис. 4c, d) показал, что самцы группы ЛПС быстрее угашают страх при измененных условиях содержания на контекст после действия звука, в ответ на звуковой сигнал угашение ускорялось незначительно (на уровне тенденции). Таким образом, у самцов группы ЛПС содержание в ОС или СИ способствовало более быстрому угашению условнорефлекторного страха на контекст.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе было показано существенное уменьшение уровня замирания в тесте 1 у крыс после социальной изоляции по сравнению с животными, содержащимися в стандартных условиях. Причем время замирания могло уменьшаться как на контекст, так и на звуковой сигнал. В литературе также имеются сведения о том, что социальная изоляция приводит к нарушению когнитивных способностей у животных. У изолянтов была нарушена выработка условнорефлекторного страха, в

тесте через 24 ч после обучения животные меньше замирали только на контекст [25, 35, 36], на контекст и сигнал [21, 24, 27, 28], или только на сигнал [26]. В то же время у мышей после 2-недельной социальной изоляции показано увеличение замирания в последствии звука при тестировании условнорефлекторного страха на звук и увеличении реактивности на ток [37]. У изолянтов нарушалась выработка условного рефлекса пассивного избегания [22], все крысы заходили в опасный отсек на следующий день после выработки. У изолянтов возникали трудности при обучении поиску скрытой платформы в водном лабиринте Морриса [21–23, 38].

Закономерно возникает вопрос о причинах такого нарушения обучения. В наших экспериментах при обучении в первый день время замирания у самцов не отличалось в группах СИ и СТАНД, это говорит о том, что животные после СИ были способны реагировать замиранием на болевые стимулы. В литературе есть данные о появлении гиперлокомоции у крыс после СИ [39]. Однако проведенные ранее нами тестирования этих же крыс в открытом поле и приподнятом крестообразном лабиринте не выявили увеличения двигательной активности после СИ, в отдельных группах наблюдалось даже ее снижение [20]. Уменьшение времени замирания в тесте 1, по-видимому, не может быть связано с увеличением двигательной активности крыс. Известно, что разные условия содержания не влияли на болевую чувствительность мышей в тесте на горячей пластинке [21, 24], это свидетельствует о том, что нарушения обучения не были связаны с изменениями болевой чувствительности и уменьшением силы подкрепления. Наиболее вероятной причиной нарушения замирания в тесте 1 является дефицит памяти, и в литературе есть подтверждение данному предположению. В большинстве работ показано, что после СИ страдает долговременная, а не кратковременная память. Так, например, после СИ нарушалась долговременная память в тесте после выработки условнорефлекторного страха [27], в то время как кратковременная рабочая память не страдала в Y-образном лабиринте и в тесте при распознавании новых объектов. Крысы после стресса социальной нестабильности, в котором животные подвергались социальной изоляции и смене партнера по клетке, показали дефицит долговременной памяти, но не кратковременной при обучении в бассейне Морриса и в тесте на пространственное расположение объектов [40]. Считают, что после СИ возникает нарушение процессов консолидации памяти, а не ее приобретения в модели выработки условнорефлекторного страха. В специальных опытах было показано нарушение под влиянием социальной изоляции консолидации памяти о страхе, при этом у животных нарушалась память через 24 ч или 4 дня после обучения, но оставалась неизменной через 90 мин и 4 ч

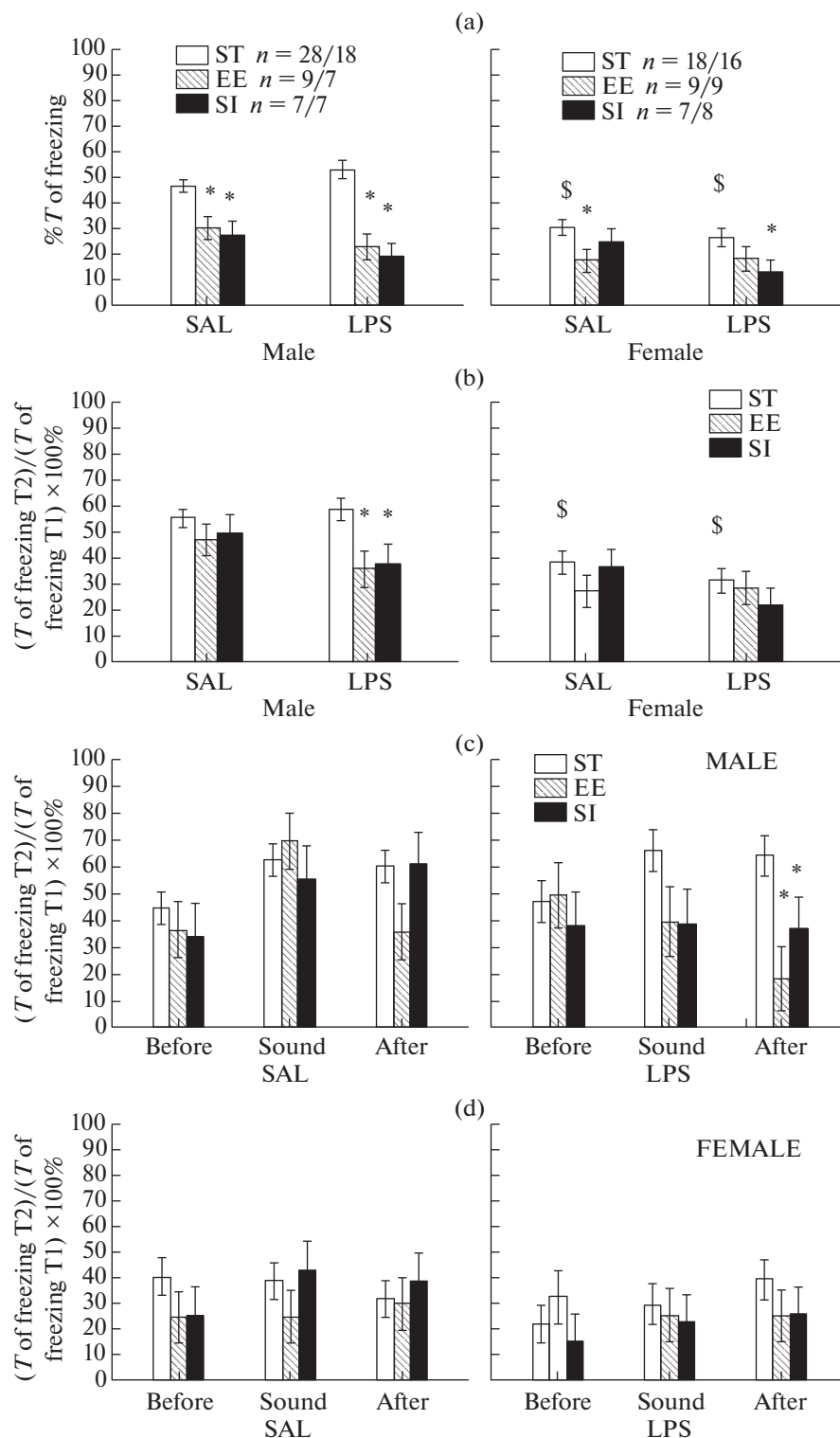


Рис. 4. Влияние различных условий содержания крыс на угашение условнорефлекторного страха. По оси абсцисс на а и б – группы крыс (SAL – группа с введением физиологического раствора в раннем онтогенезе, LPS – группа с введением ЛПС), на с и д – интервалы времени (Before – до действия звука, Sound – во время, After – после действия звука). По оси ординат – на а – % времени замирания в тесте 2, Т – время, на б–д – (Т замирания в тесте 2)/(Т замирания в тесте 1) × 100%. * – статистически значимые отличия по сравнению с ST группой ($p < 0.05$, post hoc анализ, Factorial ANOVA). \$ – различие между самцами и самками в аналогичных группах.

после выработки рефлекса [28]. Относительно механизмов нарушения консолидации памяти у изолянтов имеются отдельные сведения. У изолянтов был понижен уровень экспрессии гена *Egr-1* (“ответ раннего роста”), но не *Egr-2* в цитозольных фракциях гиппокампа и коры по сравнению с контрольными животными [28]. У изолянтов по сравнению с контролем был понижен уровень фосфорилирования сигнальных белков в гиппокампе, связанных с синаптической пластичностью, субъединицы NR1 NMDA-рецептора, кальмодулин-зависимой киназы II. Считают, что дисфункция *Egr-1* и нейросигнальной системы приводит к дефициту консолидации памяти о страхе. Имеются данные об уменьшении после СИ экспрессии субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, включенных в синаптическую пластичность [19]. Длительная СИ также вызывала ослабление длительной посттетанической потенциации нейронов поля CA1 гиппокампа [41]. При этом в гиппокампе уменьшалась экспрессия протеина PSD-95 (postsynaptic density protein-95) и глутаматных рецепторов (GluA1, NR1 и NR2B) без изменений высвобождения внеклеточного глутамата и экспрессии NR2A- и GABA_A-рецепторов. Это свидетельствует о том, что СИ в раннем возрасте нарушает постсинаптические функции и изменяет взаимодействие между AMPA- и NMDA-рецепторами, что оказывает влияние на память и обучение [41]. В механизмах возникновения поведенческих изменений после длительной социальной изоляции большую роль играет также увеличенная экспрессия нейропептида тахикинина 2 (Tas2) и нейрокина B (NkB), которая была обнаружена в дорзомедиальном гипоталамусе, центральном ядре миндалины, dBNST, дорзальном гиппокампе и передней цингулярной коре [37]. Системное или локальное введение в структуры мозга антагониста рецепторов нейрокина B (осанетанта) предотвращало поведенческие эффекты от социальной изоляции.

Обогащение среды приводило на стадии обучения к увеличению времени замирания у самцов по сравнению с животными, содержащимися в стандартных условиях. Наибольшие различия наблюдались уже при действии второго звукового сигнала, что можно объяснить более быстрым обучением крыс после обогащения среды. Подтверждают это предположение данные литературы об улучшении памяти и ускорении обучения после обогащения среды. Так, например, обогащение среды длительностью 3 нед улучшало память как об аверсивных стимулах при выработке рефлекса пассивного избегания, так и о нейтральных объектах в тесте распознавания объектов [42]. Обогащение среды ускоряло выработку рефлекса активного избегания за счет увеличения числа реакций избегания и уменьшения реакций избавления [34]. Обогащение среды приводило к более быстрому обучению

мышей в пространственных задачах в водном лабиринте Морриса [21, 33].

В тесте 1 через 24 ч крысы, содержащиеся в обогащенной среде, по сравнению с животными в стандартных условиях меньше времени замирали в ответ на контекст, но не на стимул. В литературе имеются противоречивые данные о влиянии обогащенной среды на проявление условнорефлекторного страха. С одной стороны, обогащение среды усиливало замирание на контекст в тесте при классическом оборонительном рефлексе [25], с другой стороны, обогащение среды приводило к уменьшению ответа на условные стимулы, ассоциируемые с болевым раздражением, что приводило к уменьшению способности дифференцировать сигнал и контекст [43]. Проведенное нами ранее тестирование крыс в открытом поле показало, что обогащение среды вызывало некоторое усиление двигательной активности и исследовательского поведения [20]. В литературе имеются сведения о снижении уровня тревожности после обогащения среды [18, 30–32]. Кроме того, показано наличие положительных корреляционных связей между уровнем тревожности крыс и замиранием на контекст при выработке условнорефлекторного страха [44]. Можно предположить, что снижение уровня замирания в ответ на контекст после обогащения среды может быть связано с увеличением двигательной активности и уменьшением тревожности.

Проведенный специальный анализ процентного соотношения времени замирания в тесте 2 после угашения и в тесте 1 после выработки рефлекса показал, что содержание в условиях изоляции или в обогащенной среде ускорило угашение рефлекса только в группе ЛПС у самцов, во всех других группах крыс содержание в измененных условиях не сказалось на скорости угашения. Ранее у самцов группы ЛПС, содержащихся в стандартных условиях, условнорефлекторный страх угашался хуже, чем в группе ФИЗ [12]. Имеющиеся немногочисленные данные по влиянию разных условий содержания на угашение страха отличаются от полученных нами результатов. Социальная изоляция могла тормозить угашение условнорефлекторного страха на звук [23] и нарушать снижение амплитуды стартл-рефлекса после угашения страха [45]. Длительный комбинированный стресс (ограничение движения, вынужденное плавание, социальная изоляция) приводил к нарушениям угашения условнорефлекторного страха у крыс [46]. Обогащение среды у самок мышей также замедляло угашение условнорефлекторного страха на звук в виде замирания [33]. Возможно, полученные нами данные связаны с нарушениями памяти у самцов группы ЛПС под влиянием измененных условий содержания.

Необходимо отметить, что у животных группы ЛПС наблюдались наибольшие изменения в оборонительном поведении при содержании в соци-

альной изоляции, это касалось результатов тестирования самцов и самок в тесте 1 и только самцов в тесте 2. Ранее нами было показано, что содержание в социальной изоляции оказывало наибольшее влияние на тревожно-депрессивное поведение крыс группы ЛПС [20]. В литературе представлено немного работ, в которых бы создавался двойной стресс — провоспалительный и социальный стресс. Например, в работе [2], как и в наших опытах, крысы линии Вистар получали на 3-й и 5-й дни жизни инъекции ЛПС (50 мкг/кг) или физиологического раствора. В возрасте 85 дней часть животных получала в течение трех дней ограничительный стресс (30 мин) и СИ. Крысы группы ЛПС, получавшие в зрелом возрасте комбинированный стресс, проявляли тревожное поведение в большей степени, чем контрольные животные, что авторы рассматривают как подтверждение гипотезы “двойного удара”. Это происходило, на наш взгляд, потому, что провоспалительный ЛПС-стресс в раннем возрасте вызывает сенситизацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и иммунной систем, из-за чего реакция на второй стресс оказывается более сильной, чем в случае одиночного стресса [2, 12]. СИ сама по себе способна приводить к увеличению провоспалительных цитокинов в крови [47]. В двух других работах введение ЛПС использовали в качестве второго стресса в комбинации с СИ, которая служила первым стрессом [48, 49]. При этом СИ длительностью в 2–4 нед усиливала эффекты “болезненного состояния”, вызываемого интоксикацией ЛПС или введением poly I:C, а также увеличивала уровни кортикостерона и провоспалительных цитокинов IL-6, IL-1β, фактора некроза опухоли альфа, т.е. также наблюдалась синергия двух эффектов.

ВЫВОДЫ

1. Тестирование через 24 ч после выработки классического оборонительного условного рефлекса показало, что после социальной изоляции у самцов и самок ухудшилась выработка условнорефлекторного страха, проявляющегося в виде замирания. Наибольшую чувствительность к социальной изоляции показали крысы с ранним провоспалительным стрессом, у которых уменьшилось проявление страха как на сигнал, так и контекст.

2. Обогащение среды уменьшало проявление страха в виде замирания, но в меньшей степени, чем социальная изоляция, при этом уменьшался страх только на контекст.

3. Угашение страха у самцов группы ЛПС ускорялось после социальной изоляции и обогащения среды по сравнению с животными этой группы, поддерживаемыми в стандартных условиях.

4. После раннего провоспалительного стресса взрослые животные были более уязвимы к изменениям условий содержания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 гг. по теме “Фундаментальные нейробиологические механизмы поведения, памяти и обучения в норме и при патологии” (номер государственной регистрации АААА-А17-117-92040002-6) и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 19-015-00129А и № 19-34-90022).

ВКЛАД АВТОРОВ

И.В. Павлова — планирование и проведение экспериментов, обработка данных, написание и редактирование статьи; Н.Д. Брошевицкая — методология, проведение экспериментов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maynard T.M., Sikich L., Lieberman J.A., Lamantia S. (2001) Neural development, cell–cell signaling, and the “Two-Hit” hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull* 27: 457–476. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a006887>
2. Walker A.K. [REMOVED HYPERLINK FIELD], Nakamura T., Byrne R.J., Sundresan Naicker, Tynan R.J., Hunter M., Hodgson D.M. (2009) Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology* 34: 1515–1525. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.010>
3. Lahiri D.K., Maloney B., Zawia N.H. (2009) The LEARN model: an epigenetic explanation for idiopathic neurobiological diseases. *Mol Psychiatry* 14: 992–1003. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.82>
4. Custódio C.S., Mello B.S.F., Filho A.J.M.C., de Carvalho Lima C.N., Cordeiro R.C., Miyajima F., Réus G.Z., Vasconcelos S.M.M., Barichello T., Quevedo J., de Oliveira A.C., de Lucena D.F., Macedo D.S. (2018) Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders. *Mol Neurobiol* 55: 3775–3788. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0616-1>
5. Григорьян Г.А., Дыгало Н.Н., Гехт А.Б., Степанчиков М.Ю., Гуляева Н.В. (2014) Молекулярно-клеточные механизмы депрессии. Роль глюкокортикоидов, цитокинов и нейротрофических факторов в генезе депрессивных расстройств. *Успехи физиол наук* 44: 3–20. [Grigoryan G.A., Dygalo N.N., Gekt A.B., Stepanichev M.Yu., Gulyaeva N.V. (2014) Molecularcellular

- mechanisms of depression. The role of glucocorticoids, cytokines, and neurotrophic factors in the genesis of depressive disorders. *Success fiziol sci* 44: 3–20. (In Russ)].
6. Parker G.I., Brotchie H. (2010) Gender differences in depression. *Int Rev Psychiatry* 22: 429–36.
<https://doi.org/10.3109/09540261.2010.492391>
 7. Alexander C., Rietschel E.T. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7: 167–202. PMID: 11581570
 8. Bilbo S.D., Rudy J.W., Watkins L.R., Maier S.F. (2006) A behavioural characterization of neonatal infection-facilitated memory impairment in adult rats. *Behav Brain Res* 169: 39–47.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.12.002>
 9. Tchessalova D., Tronson N.C. (2019) Memory deficits in males and females long after subchronic immune challenge. *Neurobiol Learn Mem* 158: 60–72.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.01.003>
 10. Osborne B.F., Caulfield J.I., Solomotis S.A., Schwarz J.M. (2017) Neonatal infection produces significant changes in immune function with no associated learning deficits in juvenile rats. *Dev Neurobiol* 77: 1221–1236.
<https://doi.org/10.1002/dneu.22512>
 11. Tishkina A., Stepanichev M., Kudryashova I., Freiman S., Onufriev M., Lazareva N., Gulyaeva N. (2016) Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: Effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. *Behav Brain Res* 304: 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.02.001>
 12. Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Онуфриев М.В., Моисеева Ю.В., Григорьян Г.А. (2020) Половые различия в оборонительном поведении взрослых крыс в ответ на ранний нейровоспалительный стресс. *Журн высш нерв деят* 70: 261–278. [Broshevitskaya N.D., Pavlova I.V., Zaichenko M.I., Onufriev M.V., Moiseeva Yu.V., Grigoryan G.A. (2020) The Sex Differences in Defensive Behavior of Adult Rats in Response to Early Neuroinflammatory Stress. *Zh Vyssh Nerv Deiat* 70: 261–278. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0044467720020057>
 13. Doenni V.M., Song C.M., Hill M.N., Pittman Q.J. (2017) Early-life inflammation with LPS delays fear extinction in adult rodents. *Brain Behav Immun* 63: 176–185.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.022>
 14. Harre E.M., Galic M.A., Mouihate A., Noorbakhsh F., Pittman Q.J. (2008) Neonatal inflammation produces selective behavioral deficits and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 27: 644–653.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06031.x>
 15. Kohman R.A., Tarr A.J., Sparkman N.L., Bogale T.M., Boehm G.W. (2008) Neonatal endotoxin exposure impairs avoidance learning and attenuates endotoxin-induced sickness behavior and central IL-1 β gene transcription in adulthood. *Behav Brain Res* 194: 25–31.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.06.018>
 16. Lukkes J.L., Watt M.J., Lowry C.A., Forster G.L. (2009) Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. *Front Behav Neurosci* 3: 18.
<https://doi.org/10.3389/neuro.08.018.2009>
 17. Zhang Y., Zu X., Luo W., Yang H., Luo G., Zhang M. (2012) Social isolation produces anxiety-like behaviors and changes PSD-95 levels in the forebrain. *Neurosci Lett* 514: 27–30.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.043>
 18. Guarnieri L.O., Pereira-Caxeta A.R., Medeiros D.C., Aquino N.S.S., Szawka R.E., Mendes E.M.A., Moraes M.F.D., Pereira G.S. (2020) Pro-neurogenic effect of fluoxetine in the olfactory bulb is concomitant to improvements in social memory and depressive-like behavior of socially isolated mice. *Transl Psychiatry* 10: 33.
<https://doi.org/10.1038/s41398-020-0701-5>
 19. Wang H.T., Huang F.L., Hu Z.L., Zhang W.J., Qiao X.Q., Huang Y.Q., Dai R.P., Li F., Li C.Q. (2017) Early-life social isolation-induced depressive-like behavior in rats results in microglial activation and neuronal histone methylation that are mitigated by minocycline. *Neurotox Res* 31: 505–520.
<https://doi.org/10.1007/s12640-016-9696-3>
 20. Павлова И.В., Брошевицкая Н.Д., Зайченко М.И., Григорьян Г.А. (2021) Влияние социальной изоляции и обогащенной среды на тревожно-депрессивное поведение крыс в норме и после раннего провоспалительного стресса. *Журн высш нерв деят* 71 (5): 655–667. [Pavlova I.V., Broshevitskaya N.D., Zaichenko M.I., Grigoryan G.A. (2021) The Influence of Social Isolation and Enriched Environment on Anxious and Depressive-like Behavior of Rats in Norm and After the Early Proinflammatory Stress. *Zh Vyssh Nerv Deiat* 71 (5): 655–667. (In Russ)].
 21. Kuleshkaya N., Rauvala H., Voikar V. (2011) Evaluation of social and physical enrichment in modulation of behavioural phenotype in C57BL/6J female mice. *PLoS One* 6: e24755.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024755>
 22. Krupina N.A., Shirenova S.D., Khlebnikova N.N. (2020) Prolonged social isolation, started early in life, impairs cognitive abilities in rats depending on sex. *Brain Sci* 10: 799.
<https://doi.org/10.3390/brainsci10110799>
 23. Hori M., Yamada K., Ohnishi J., Sakamoto S., Furuie H., Murakami K., Ichitani Y. (2014) Tickling during adolescence alters fear-related and cognitive behaviors in rats after prolonged isolation. *Physiol Behav* 131: 62–67.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.04.008>
 24. Voikar V., Polus A., Vasar E., Rauvala H. (2005) Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav* 4: 240–252.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00106.x>
 25. Mora-Gallegos A., Fornaguera J. (2019) The effects of environmental enrichment and social isolation and their reversion on anxiety and fear conditioning. *Behav Processes* 158: 59–69.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.10.022>
 26. Badowska D.M., Brzozka M.M., Chowdhury A., Malzahn D., Rossner M.J. (2015) Data calibration and reduction allows to visualize behavioural profiles of psychosocial influences in mice towards clinical domains. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 165: 483–496.
<https://doi.org/10.1007/s00406-014-0532-6>
 27. Ouchi H., Ono K., Murakami Y., Matsumoto K. (2013) Social isolation induces deficit of latent learning perfor-

- mance in mice: a putative animal model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Behav Brain Res* 238: 146–153.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.029>
28. Okada R., Marsumoto K., Tsushima R., Fujiwara H., Tsuneyama K. (2014) Social isolation stress-induced fear memory deficit is mediated by down-regulated neuro-signaling system and Egr-1 expression in the brain. *Neurochem Res* 39: 875–882.
<https://doi.org/10.1007/s11064-014-1283-5>
 29. Matsumoto K., Fujiwara H., Araki R., Yabe T. (2019) Post-weaning social isolation of mice: a putative animal model of developmental disorders. *J Pharmacol Sci* 141: 111–118.
<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2019.10.002>
 30. Mileva G.R., Bielajew C. (2015) Environmental manipulation affects depressive-like behaviours in female Wistar-Kyoto rats. *Behav Brain Res* 293: 208–216.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.035>
 31. Grippo A.J., Ihm E., Wardwell J., McNeal N., Scotti M.A., Moenk D.A., Chandler D.L., LaRocca M.A., Preihs K. (2014) The effects of environmental enrichment on depressive and anxiety-relevant behaviors in socially isolated prairie voles. *Psychosom Med* 76: 277–284.
<https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000052>
 32. Brenes J.C., Fornaguera J., Sequeira-Cordero A. (2020) Environmental enrichment and physical exercise attenuate the depressive-like effects induced by social isolation stress in rats. *Front Pharmacol* 11: 804.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00804>
 33. Pietropaolo S., Feldon J., Alleca E., Cirulli F., Yee B.K. (2006) The role of voluntary exercise in enriched rearing: a behavioral analysis. *Behav Neurosci* 4: 787–803.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.4.787>
 34. Pietropaolo S., Feldon J., Yee B.K. (2014) Environmental enrichment eliminates the anxiety phenotypes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cogn Affect Behav Neurosci* 14: 996–1008.
<https://doi.org/10.3758/s13415-014-0253-3>
 35. Weiss I.C., Pryce C.R., Jongen-Relo A.L., Nanz-Bahr N.I., Feldon J. (2004) Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav Brain Res* 152: 279–295.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.015>
 36. Hsiao Y.H., Kuo J.R., Chen S.H., Gean P.W. (2012) Amelioration of social isolation-triggered onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficit by N-acetylcysteine in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 45: 1111–1120.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.031>
 37. Zelikowsky M., Hui M., Karigo T., Gradinaru V., Deverman B.E., Anderson D.J. (2018) The neuropeptide Tac2 controls a distributed brain state induced by chronic social isolation stress. *Cell* 173: 1265–1279.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.037>
 38. Hellemans K.G., Bengel L.C., Olmstead M.C. (2004) Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Dev Brain Res* 150: 103–115.
<https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.03.003>
 39. Heidbreder C.A., Weiss I.C., Domeney A.M., Pryce C., Homborg J., Hedou G., Feldon J., Moran M.C., Nelson P. (2000) Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100: 749–68.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00336-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00336-5)
 40. Green M.R., McCormick C.M. (2013) Effects of social instability stress in adolescence on Long-Term, Not short-term, spatial memory performance. *Behav Brain Res* 256: 165–171.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.011>
 41. Wang B., Wu Q., Lei L., Sun H., Michael N., Zhang X., Wang Y., Zhang Y., Ge B., Wu X., Wang Y., Xin Y., Zhao J., Li S. (2019) Long-term social isolation inhibits autophagy activation, induces postsynaptic dysfunctions and impairs spatial memory. *Exp Neurol* 311: 213–224.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.09.009>
 42. Leger M., Paizanis E., Dzahini K., Quiedeville A., Bouet V., Cassel J.C., Freret T., Schumann-Bard P., Boulouard M. (2015) Environmental enrichment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice. *Cereb Cortex* 25: 4048–4061.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhu119>
 43. Walasek G., Wesierska M., Werka T. (2002) Effects of social rearing conditions on conditioned suppression in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 62: 25–31. PMID: 12004570
 44. Павлова И.В., Рысакова М.П. (2015) Проявление тревожности крыс Вистар при выработке условнорефлекторного страха. *Журн высш нерв деят* 65: 719–735. [Pavlova I.V., Rysakova M.P. (2015) The manifestation of the anxiety during fear conditioning in Wistar rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat* 65: 720–734. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S0044467715050123>
 45. Skelly M.J., Chapell A.E., Carter E., Weiner J.L. (2015) Adolescent social isolation increases anxiety-like behavior and ethanol intake and impairs fear extinction in adulthood: possible role of disrupted noradrenergic signaling. *Neuropharmacology* 97: 149–159.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.025>
 46. Noble L.J., Gonzalez I.J., Meruva V.B., Callahan K.A., Belfort B.D., Ramanathan K.R., Meyers E., Kilgard M.P., Rennaker R.L., McIntyre C.K. (2017) Effects of vagus nerve stimulation on extinction of conditioned fear and post-traumatic stress disorder symptoms in rats. *Transl Psychiatry* 7: e1217.
<https://doi.org/10.1038/tp.2017.191>
 47. Alshammari T.K., Alghamdi H., Alkhader L.F., Alqahtani Q., Alrasheed N.M., Yacoub H., Alnaem N., AlNakiyah M., Alshammari M.A. (2020) Analysis of the molecular and behavioral effects of acute social isolation on rats. *Behav Brain Res* 377: 112191.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112191>
 48. Gibb J., Hayley S., Gandhi R., Poulter M.O., Anisman H. (2008) Synergistic and additive actions of a psychosocial stressor and endotoxin challenge: Circulating and brain cytokines, plasma corticosterone and behavioral changes in mice. *Brain Behav Immun* 22: 573–589.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.12.001>
 49. Gandhi R., Hayley S., Gibb J., Merali Z., Anisman H. (2007) Influence of poly I:C on sickness behaviors, plasma cytokines, corticosterone and central monoamine activity: moderation by social stressors. *Brain Behav Immun* 21: 477–489.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.12.005>

THE INFLUENCE OF SOCIAL ISOLATION AND ENRICHED ENVIRONMENT ON FEAR CONDITIONING IN ADULT RATS EXPOSED TO NEONATAL PROINFLAMMATORY STRESS

I. V. Pavlova^a and N. D. Broshevitskaya^a

^a *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

In rats exposed to neonatal proinflammatory stress (lipopolysaccharide, LPS, injection on the 3rd and 5th neonatal days; 50 µg/kg), the effect of housing under conditions of social isolation or enriched environment at the age of 1.5 to 4 months on fear conditioning and extinction was studied. Testing 24 h after training showed that social isolation impairs fear conditioning both in males and females, as manifested in reducing the freezing time. A maximum sensitivity to social isolation was detected in rats that were exposed to LPS-induced proinflammatory stress in the early neonatal period: their freezing time was reduced both to a cue and a context. Fear reduction is assumed to be associated with memory deficit. Environmental enrichment also reduced the freezing time but to a lesser extent than social isolation, while reducing fear only to a context. Fear extinction in males of the LPS group accelerated after social isolation and environmental enrichment compared to rats of the same group housed under standard conditions. Our results demonstrate that adult animals that were exposed to neonatal proinflammatory stress are more vulnerable to changes in housing conditions.

Keywords: social isolation, environmental enrichment, LPS, neonatal proinflammatory stress, fear conditioning, fear extinction

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КАЛЬРЕТИНИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ В ПОЯСНИЧНОМ ОТДЕЛЕ СПИННОГО МОЗГА КОШКИ (*FELIS CATUS*)

© 2021 г. А. А. Вещицкий¹, П. Е. Мусиенко^{1,2,3}, Н. С. Меркульева^{1,*}

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт трансляционной биомедицины СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

³ Клиника детской хирургии и ортопедии, НИИФ МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: mer-natalia@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.01.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 21.04.2021 г.

Многообразие нейронных сетей ЦНС определяется, в том числе, гетерогенностью популяций нейронов в ее составе. В качестве маркеров нейронов разных морфотипов могут выступать кальций-связывающие белки, среди которых одним из наиболее распространенных является кальретинин. В настоящей работе с помощью непрямого иммуногистохимического метода были маркированы кальретинин-иммунопозитивные нейронные популяции поясничных сегментов спинного мозга кошки. В исследовании было выявлено 19 морфотипов нейронов, имеющих строгую посегментную и ламинарную локализацию, сделана попытка сопоставления предполагаемой функции этих нейронов с данными литературы. Среди выявленных морфотипов три локализируются в пластине I и соответствуют нейронам, участвующим в передаче болевой и температурной информации. В пластине II обнаружены клетки одного морфотипа, на которых сходятся болевые афференты. Три типа пучковых нейронов, передающих информацию от периферических механо- и ноцицепторов в супраспинальные структуры, представлены в пластинках III–IV. Пластинки V–VI характеризуются функционально разными нейронами пяти морфотипов: интернейронами ядер Кларка и аналогичной зоны каудальных поясничных сегментов, на которые сходятся проприоцептивная информация; нейронами на латеральной границе между белым и серым веществом, отвечающими на болевые и тактильные сигналы, и двумя типами неупорядоченно распределенных вставочных, пучковых или проприоспинальных клеток, получающих разнородные афферентные сигналы от мышечных веретен. В пластинках VII–VIII выявлены два типа симпатических преганглионарных нейронов (в интермедиолатеральном и интеркалированном ядрах), интернейроны Реншоу и три типа разноразмерных дисперсно распределенных мультиполярных клеток, определение функции для которых является затруднительным. В пластине IX, представленной мотонейронными пулами, иммунопозитивных нейронов не обнаружено. Вокруг центрального канала в пластине X локализованы редкие нейроны, функция для которых, в силу малого числа их морфологических признаков, не определена.

Ключевые слова: кальций-связывающий белок, кальретинин, спинной мозг, картирование, кошка

DOI: 10.31857/S0044452921040082

ВВЕДЕНИЕ

В эукариотической клетке ионы кальция выступают в качестве вторичного мессенджера, обеспечивающего регуляцию важнейших внутриклеточных процессов, реализация которых возможна за счет работы кальций-связывающих белков [1]. В нейронах и их отростках содержится несколько типов кальций-связывающих белков, отличающихся скоростью связывания ионов кальция (см. обзор [2]). Некоторые из этих типов белков экспрессируются конкретными элементами центральной и пе-

риферической нервной системы. Так, в спинном мозге парвальбумин маркирует систему проприоцептивной чувствительности (псевдоуниполярные нейроны дорзальных ганглиев [3, 4], восходящие пути дорзального канатика [5], волокна и нейроны ядер Кларка [6]), а также популяцию тормозных Ia-интернейронов промежуточного серого вещества [7], кальбиндин – тормозные клетки Реншоу [8], комиссуральные V1 интернейроны [7], интернейроны дорзальных рогов и промежуточного серого вещества, получающие разномодальные пе-

риферические и супраспинальные сигналы [9], а также специфичные популяции нейронов висцерального отдела нервной системы — преганглионарные клетки интермедиолатерального ядра (ИМЛ) [10], кальцинеурин — ограниченное число популяции альфа-мотонейронов, обеспечивающих иннервацию быстрых мышечных волокон [11] и т.д. Таким образом, иммуногистохимическая визуализация кальций-связывающих белков является эффективным средством функционального картирования нервной системы.

Одним из наиболее распространенных среди кальций-связывающих белков является также кальретинин (CR), экспрессирующийся в нейронах коры больших полушарий [12], мозжечка [13], таламуса [14], чувствительных ганглиев [15], спинного мозга [5, 16] и т.д. В силу своих молекулярных особенностей данный кальций-связывающий белок в зависимости от концентрации ионов кальция в нейроне может выступать в качестве быстрого или медленного буфера (см. обзор [2]), а также модулировать возбудимость клетки [17].

Спинальный нейрональный аппарат играет ключевую роль в генерации локомоторной активности [18], управлении позой тела, баланса при активном передвижении [19], интегративном висцеральном и сенсомоторном контроле [20, 21]. При различного рода нейродегенеративных заболеваниях спинного мозга происходит нарушение и утрата этих функций. При этом нейроны, экспрессирующие разные кальций-связывающие белки, обладают разной резистентностью к воздействию патологических факторов (см. обзор [22]): например, при болезни Альцгеймера сохраняются нейроны, экспрессирующие кальретинин, но не кальбиндин; и наоборот, при боковом амиотрофическом склерозе именно экспрессирующие кальретинин нейроны повреждаются в первую очередь [23]. Таким образом, существует необходимость в идентификации и систематизации нейронных популяций, экспрессирующих разные кальций-связывающие белки, для понимания того, на какие именно нейронные сети и каким образом могут влиять те или иные нейродегенеративные заболевания спинного мозга.

Целью настоящего исследования является выявление разнообразия возможных морфотипов нервных клеток, экспрессирующих кальций-связывающий белок CR, в пределах поясничного утолщения спинного мозга кошки — классического объекта исследования сенсомоторных сетей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено в соответствии с требованиями Директивы Совета Европейского Парламента по защите животных, используемых для

экспериментальных и других научных целей (2010/63EU) и с одобрения Комиссии по этике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 5/3 от 28.01.17). В работе использованы образцы поясничного отдела спинного мозга от 6 нормально пигментированных взрослых кошек (весом 2.5–3.5 кг). Все животные, за исключением одного, были предварительно децеребрированы и участвовали в нейрофизиологическом эксперименте, описанном в работах [24, 25]. Данный подход был использован с целью гуманного использования экспериментальных животных в ряде нейроморфологических исследований [16, 26].

Подготовка гистологического материала. Через 4–5 ч после децеребрации экспериментальных объектов под глубоким наркозом (5% изофлюран) проводили транскардиальную перфузию. Промывку сосудов от форменных элементов крови осуществляли физиологическим раствором (0.9% натрия хлорид, 700–800 мл/кг, pH 7.4, 25°C), фиксацию тканей — 4%-ным раствором параформальдегида на 0.01 М фосфатном буфере (pH 7.4, 600–700 мл/кг, 25°C). После перфузии спинной мозг извлекали из позвоночника и последовательно выдерживали в 20 и 30% растворах сахарозы до погружения. Деление спинного мозга на сегменты (L1–L7) проводили, ориентируясь на дорзальные корешки [27]. На замораживающем микротоме (Reichert, Германия) изготавливали поперечные срезы толщиной 50 мкм.

Иммуногистохимия. Выявление CR проводили с помощью непрямого иммуногистохимического метода на свободно плавающих срезах. В начале выполнения протокола и между всеми процедурами срезы промывали в 0.01 М фосфатно-солевом буфере 3 раза по 10 мин. Демаскировку антигенов проводили в 1% NaBH₄ в течение 15 мин [28]. Активность эндогенной пероксидазы блокировали путем получасовой инкубации в 0.3% H₂O₂. Неспецифическое связывание антител подавляли 5% нормальной сывороткой козы (NGS, Vector Labs, Великобритания) (90 мин). Затем, не промывая, срезы инкубировали в течение 72 ч при +4°C в растворе первичных моноклональных антител мыши к CR (MAV1568, Millipore, США, разведение 1:1000) с добавлением 5% нормальной сыворотки козы и консерванта 0.01% NaN₃. Затем срезы инкубировали в растворе биотинилированных вторичных антител антимышь (1:600, Vector Laboratories, Великобритания) в течение 24 ч. К раствору вторичных антител также добавляли 5% нормальную сыворотку козы и 0.1% NaN₃. Затем срезы инкубировали в авидин-биотиновом комплексе с пероксидазой (ABC Elite system, Vector Labs, Великобритания) в течение 1 ч. Визуализацию пероксидазной реакции осуществляли с помощью раствора, содержащего 1% DAB (хромоген 3,3'-диаминобензи-

дин), 10% NiNH_4SO_4 и 0.03% H_2O_2 . После промывки в дистиллированной воде срезы монтировали на желатинизированные предметные стекла, высушивали, подвергали обезжизиванию в спиртах восходящей концентрации ($2 \times 70\%$, $2 \times 96\%$, $2 \times 100\%$) и просветлению в ксилоле, после чего заключали в монтирующую среду (Bio Mount НМ, Италия). Для выявления специфичности антител несколько срезов спинного мозга подвергали стандартному иммуногистохимическому протоколу, но исключали этап добавления первичных или вторичных антител. В таком случае срезы спинного мозга были лишены иммунопозитивной метки.

Цифровая обработка и анализ гистологического материала. Получение цифровых изображений срезов с выявленными антигенами проводили на компьютерной установке, оснащенной световым микроскопом Olympus CX31 (Olympus Corporation, Япония; увеличение объектива $\times 10$), свободно распространяемым программным комплексом *digitalCamControl* и камерой Nikon (D3200, Nikon Corporation, Япония). В нервной системе CR экспрессируется исключительно в нейронах [29, 30], поэтому иммунопозитивные клетки, у которых на срезе не визуализировались отростки, тоже были взяты в анализ. Подсчет площади сомы иммунопозитивных нейронов, коррекцию контраста и яркости изображений проводили в свободном программном комплексе *Fiji* [31]. Деление серого вещества на пластины проводили вручную на основе атласа спинного мозга кошки [32]. Классификацию иммунопозитивных нейронов осуществляли на основе особенностей формы (оценка формы производилась визуально) и размера сомы, типа отхождения отростков (если они визуализируются), локализации клеток. В зависимости от формы сомы (для клеток без отростков) нейроны делили на овальные, округлые и плоские; в зависимости от типа отхождения иммунопозитивных отростков (при их наличии) — на веретеновидные (клетки с двумя биполярно отходящими отростками) и мультиполярные (клетки с тремя и более отростками). К нейронам мелкого размера относили клетки площадью до 200 мкм^2 , среднего — $200\text{--}450 \text{ мкм}^2$, крупного — более 450 мкм^2 в соответствии с делением, представленным в работе [16]. Среднее число $\pm$ стандартное отклонение (SD) нейронов в пластине или группе пластин и в сегменте и средняя площадь сомы $\pm$ SD для нейронов каждого морфотипа анализировали в программе *Prism 8.0* (GraphPad Software, США). Различия средней площади для каждого типа нейронов, находящихся в наименьшем и наибольшем по своей площади сегментах, оценивали по коэффициенту С, вычисляемому путем деления средней площади нейронов одного типа в наиболее каудальном для данного типа сегменте поясничного отдела (САА) на среднюю пло-

щадь нейронов этого типа в наиболее ростральном для данного типа сегменте (РАА) (рис. 1, а 2). Данный коэффициент наглядно показывает, наблюдается ли изменение площади сомы каждого типа нейронов в зависимости от площади серого вещества.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В сером веществе поясничных сегментов спинного мозга кошки выявлены нейроны, экспрессирующие кальций-связывающий белок CR. Число кальцитинин-иммунопозитивных (CR+) нейронов зависит от сегмента спинного мозга: градуально увеличивается в rostrocaudalном направлении, достигая максимума в сегментах L6 и L7 (рис. 1, а 1). При этом среднее число нейронов в сегменте согласуется с площадью серого вещества — увеличению общей площади серого вещества соответствует увеличение числа CR+ нейронов (рис. 1, а 1).

CR+ нейроны представлены большим разнообразием морфотипов (табл. 1) и локализуются во всех пластинах (по Рекседу [32]) серого вещества; при этом разные типы CR+ нейронов имеют четкие границы зон своей локализации в пределах как одной, так и нескольких пластин, что отражено на рисунках и далее по тексту.

Распределение CR+ нейронов в дорзальных рогах спинного мозга

Пластина I

В пластине I каждой половины среза спинного мозга визуализируется до 3 CR+ нейронов. Среди них выявлены: 1) мелкие веретеновидные, 2) мелкие овальные, 3) средние мультиполярные.

Клетки первого типа (веретеновидные) характеризуются вытянутой вдоль кривизны дорзального рога сомой малого размера (площадь $116 \pm 42 \text{ мкм}^2$) (рис. 1, b 1). В отростках нейронов данного типа иммунопозитивная реакция отсутствует. Локализуются преимущественно в центральной части пластины I, иногда более латерально — ближе к тракту Лиссауэра (зона 1 на рис. 1, b).

Клетки второго типа (овальные) имеют округлую форму и малый размер сомы (площадь $101 \pm 41 \text{ мкм}^2$) (рис. 1, b 2). Метка в отростках отсутствует. Локализуются преимущественно в дорзолатеральной части пластины I — в области тракта Лиссауэра (зона 1 на рис. 1, b).

Клетки третьего типа имеют мультиполярную форму и значительно более крупную сому (площадь $223 \pm 104 \text{ мкм}^2$) (рис. 1, b 3). Данные нейроны в пределах пластины I локализуются в наиболее латеральной части дорзального рога — на границе с пластиной II (зона 2 на рис. 1, b). Отростки данных

Таблица 1. Типы CR+ нейронов поясничного отдела спинного мозга

№	Пластины	Сегменты	Локализация	Тип нейронов	Площадь, мкм ²	Рисунок
1	I	L1–L7	Центральная часть	Мелкие веретеновидные	116 ± 42 $n = 120$	1, b 1
2	I	L1–L7	Рядом с трактом Лиссауэра	Мелкие овальные	101 ± 41 $n = 109$	1, b 2
3	I	L1–L7	Латеральная поверхность дорзального рога	Средние мультиполярные	223 ± 104 $n = 42$	1, b 3
4	II	L1–L7	Преимущественно в IIi	Мелкие округлые	43 ± 7 $n = 3001$	1, b 4
5	III–IV	L1–L7	—	Мелкие веретеновидные	54 ± 10 $n = 564$	1, b 5
6	III–IV	L1–L7	—	Мелкие мультиполярные	60 ± 12 $n = 616$	1, b 6
7	III–IV	L1–L7	—	Средние мультиполярные	215 ± 64 $n = 282$	1, b 7
8	V–VI	L1–L4	Ядра Кларка	Мелкие овальные	85 ± 19 $n = 918$	2, a 1
9	V–VI	L5–L7	Граница пластин VI, VII и X	Мелкие плоские	75 ± 18 $n = 332$	2, a 2
10	V–VI	L1–L7	Латеральная граница между белым и серым веществом	Средние мультиполярные	284 ± 99 $n = 208$	2, a 5
11	V–VI	L1–L7	—	Мелкие мультиполярные	104 ± 23 $n = 1363$	2, a 3
12	V–VI	L1–L7	—	Средние мультиполярные	316 ± 44 $n = 549$	2, a 4
13	VII–VIII	L1–L4	Интермедиолатеральное ядро	Мелкие мультиполярные	178 ± 62 $n = 764$	3, a 1
14	VII–VIII	L3–L4	Дорзальная граница пластины VII	Средние мультиполярные	324 ± 66 $n = 96$	3, a 2
15	VII–VIII	L5–L7	Вентральная граница пластины VII	Средние овальные	371 ± 58 $n = 404$	3, a 6
16	VII–VIII	L1–L7	—	Мелкие мультиполярные	173 ± 17 $n = 1536$	3, a 3
17	VII–VIII	L1–L7	—	Средние мультиполярные	374 ± 31 $n = 1224$	3, a 4
18	VII–VIII	L1–L7	—	Крупные мультиполярные	925 ± 74 $n = 842$	3, a 5
19	X	L1–L7	—	Мелкие овальные	93 ± 27 $n = 235$	2, a 6

нейронов, направленные параллельно кривизне дорзального рога, также иммунопозитивны.

У всех трех типов нейронов площадь сомы увеличивается от сегмента к сегменту (рис. 1, с 1); таким образом, нейроны пластины I в сегменте L7 по средней площади сомы крупнее более чем в два раза нейронов в сегменте L1 (рис. 1, а 2).

Пластина II

В пластине II выявлен один тип CR+ нейронов, имеющих округлую сомю малого размера (площадь 43 ± 7 мкм²) (рис. 1, b 4). Располагаются клетки цепочкой, преимущественно во внутренней части пластины (подслое IIi) (зона 3 на рис. 1, b). Иногда, в более каудальных сегментах, данные нейроны

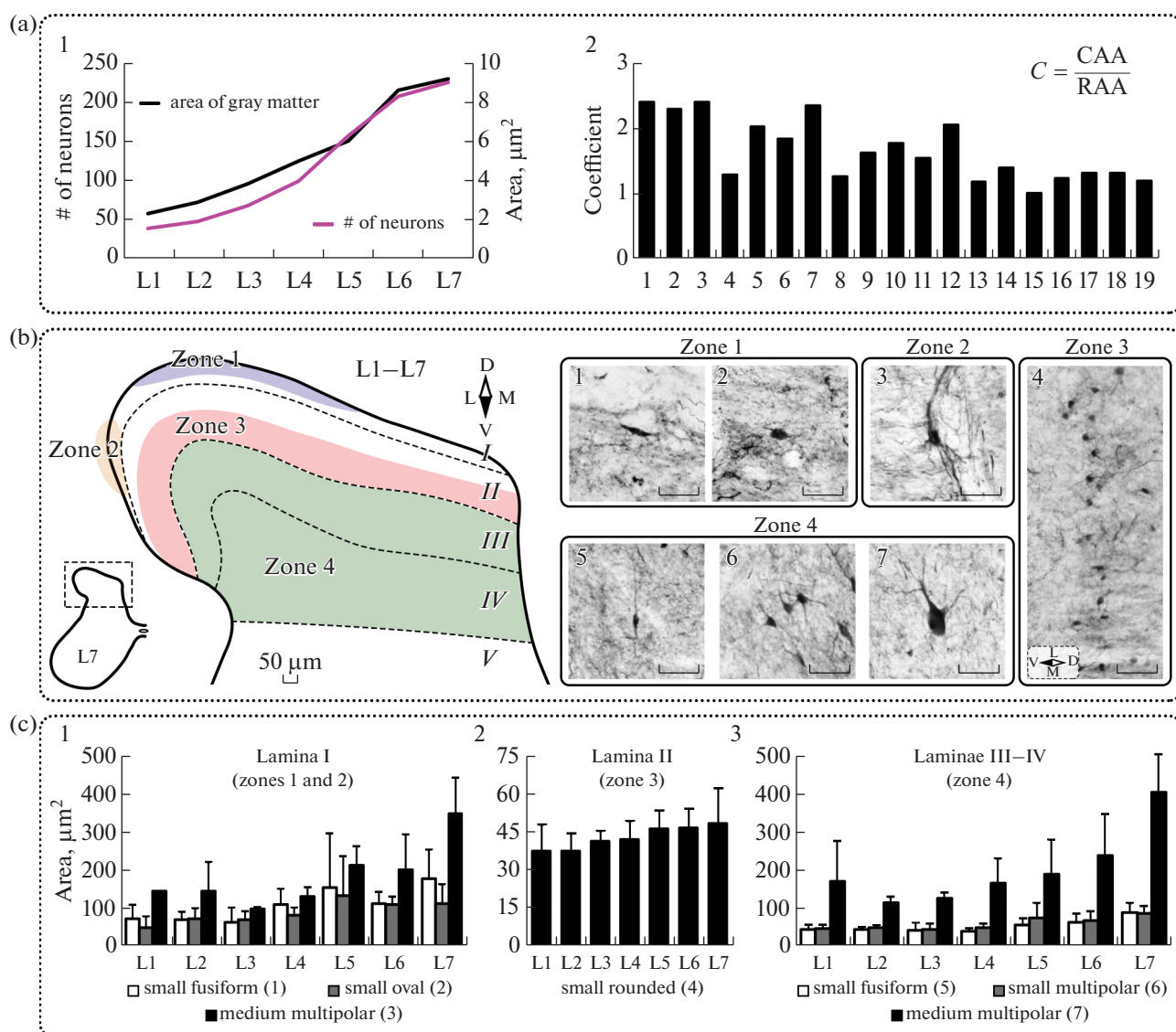


Рис. 1. Общие характеристики и распределение CR⁺ нейронов в дорсальном роге спинного мозга кошки. (а) — особенности распределения CR⁺ нейронов: 1 — отношение между средней площадью серого вещества и средним числом CR⁺ нейронов; 2 — коэффициент отношения средней площади CR⁺ нейронов каждого типа (номера типов см. табл. 1), где С — коэффициент, CAA — средняя площадь нейронов одного типа в наиболее каудальном для данного типа сегменте поясничного отдела, RAA — средняя площадь нейронов одного типа в наиболее ростральном для данного типа сегменте поясничного отдела. Значения представлены как среднее + SD. (б) — типы нейронов и их локализация: 1 — мелкие веретеновидные нейроны пластины I; 2 — мелкие овальные нейроны пластины II; 3 — средние мультиполярные нейроны пластины II; 4 — мелкие округлые нейроны пластины II; 5 — мелкие веретеновидные нейроны пластин III–IV; 6 — мелкие мультиполярные нейроны пластин III–IV; 7 — средние мультиполярные нейроны пластин III–IV. Черной штриховой линией обозначены границы пластин серого вещества. Римскими цифрами обозначены номера пластин. Разными цветами и арабскими цифрами обозначены зоны локализации нейронов. Латинскими буквами D, V, M, L обозначены стороны среза (соответственно, дорсальная, вентральная, медиальная, латеральная). Калибровочный маркер на всех изображениях равен 50 мкм. (с) — площадь CR⁺ нейронов разных морфотипов: 1 — площадь нейронов пластины I; 2 — площадь нейронов пластины II; 3 — площадь нейронов пластин III–IV. Значения представлены как среднее + SD.

формируют скопления, однако, упорядоченной кластеризации таких скоплений не обнаружено. Размер сомы от сегмента к сегменту значительно не меняется (рис. 1, а 2; рис. 1, с 2). Отростки практически не видны, иногда визуализируются единичные биполярно отходящие в дорсальном и вентральном направлении.

Пластины III–IV

В пластинках III и IV (зона 4 на рис. 1, б) выявлены три морфотипа CR⁺ нейронов, локализующихся без какой-либо упорядоченности: 1) мелкие веретеновидные, 2) мелкие мультиполярные, 3) средние мультиполярные.

Веретеновидные нейроны имеют овальную форму (рис. 1, b 5) и малый размер сомы (площадь 54 ± 10 мкм²), который от сегмента к сегменту значительно не варьирует (рис. 1, a 2; рис. 1, c 3). Биполярно отходящие от сомы отростки ориентированы перпендикулярно кривизне дорзального рога.

Мультиполярные нейроны пластин III–IV формируют две популяции клеток, существенно отличающихся по размерам. У более многочисленной популяции мелких нейронов (60 ± 12 мкм²) имеются 3–4 CR+ отростка, отходящих от сомы в разные стороны (рис. 1, b 6). Размер сомы от сегмента к сегменту увеличивается, достигая максимума в L7 (рис. 1, a 2; рис. 1, c 3). Более крупные (215 ± 64 мкм²) мультиполярные нейроны пластин III–IV имеют несколько разнонаправленных отростков (рис. 1, b 7). Средний размер сомы в сегментах L1–L6 существенно не меняется (рис. 1, c 3), однако в сегменте L7 площадь клеток данного типа значительно больше, чем в остальных: отношение средней площади нейронов данного типа в сегменте L7 к нейронам того же типа в L1 равно 2.4 (рис. 1, a 2).

Распределение CR+ нейронов в промежуточном сером веществе спинного мозга

Пластины V–VI

В пластинах V и VI выявлено 5 морфотипов CR+ нейронов: 1) мелкие овальные, 2) мелкие плоские, 3) средние мультиполярные, 4) мелкие мультиполярные, 5) крупные мультиполярные.

В ядрах Кларка, локализованных в пределах поясничного отдела в медиальной части пластин V–VI сегментов L1–L4 (зона 1 на рис. 2, a), выявлены мелкие (85 ± 19 мкм²) овальные нейроны (рис. 2, a 1), площадь сомы которых в разных сегментах сходна (рис. 1, a 2; рис. 2, b 1). Некоторые из них имеют 1–3 CR+ отростка.

В аналогичных ядрах Кларка областях сегментов L5–L7 (зона 2 на рис. 2, a) выявлены нейроны малого размера (75 ± 18 мкм²), для которых характерна уплощенная вытянутая форма (рис. 2, a 2). Размер сомы в сегментах L5–L6 отличается незначительно и увеличивается в сегменте L7 (рис. 1, a 2; рис. 2, b 2).

На латеральной границе между серым и белым веществом (зона 4 на рис. 2, a) локализованы средние по размеру (284 ± 99 мкм²) вытянутые вдоль кривизны шейки дорзального рога нейроны (рис. 2, a 5). Закономерных изменений площади сомы в разных сегментах не наблюдается (рис. 2, b 5). От тела этих нейронов в дорзовентральном направлении отходит множество иммунопозитивных отростков.

В остальной части пластин V–VI (зона 3 на рис. 2, a) всех поясничных сегментов выявлены не-

упорядоченно распределенные мультиполярные нейроны малого (104 ± 23 мкм²) (рис. 2, a 3) и среднего (316 ± 44 мкм²) размера (рис. 2, a 4). Для обоих типов клеток происходит постепенный прирост площади сомы в более каудальных сегментах (рис. 1, a 2; рис. 2, b 3; рис. 2, b 4).

Пластина X

В пластине X (зона 5 на рис. 2, a) выявлены редкие мелкие (93 ± 27 мкм²) CR+ нейроны овальной формы (рис. 2, a 6), лишенные различных отростков. Закономерных тенденций изменения площади сомы этих клеток по сегментам не обнаружено — для всех сегментов их площадь составляет около 80 мкм² и только в сегментах L4 и L6 в среднем приближается к 120 мкм², однако в силу высоких разбросов данные различия не достоверны (рис. 2, b 6).

Распределение CR+ нейронов в вентральных рогах спинного мозга

Пластины VII–VIII

В пластинах VII и VIII выявлено 6 морфотипов CR+ нейронов: 1) мелкие мультиполярные (в боковых рогах), 2) средние мультиполярные, 3) средние овальные, 4) мелкие мультиполярные, 5) средние мультиполярные, 6) крупные мультиполярные.

В интермедиолатеральных ядрах (ИМЛ, IML; зона 1 на рис. 3, a) боковых рогов сегментов L1–L4 выявлены группы CR+ нейронов малого размера (178 ± 62 мкм²), имеющих во всех сегментах сходную площадь сомы (рис. 3, b 1). Нейроны данного типа характеризуются разной формой: округлой, плоской или мультиполярной (рис. 3, a 1). Редко видны множественные отходящие отростки, иммунопозитивные только у основания; иногда толстые CR+ отростки выходят из ИМЛ достаточно глубоко в белое вещество перпендикулярно серому.

В сегментах L3–L4 вдоль дорзальной границы пластины VII (зона 2 на рис. 3, a) выявлены пучки CR+ волокон, идущих от ИМЛ к интермедиомедиальному ядру. Вдоль данных волокон располагаются несколько средних по размеру (324 ± 66 мкм²) мультиполярных CR+ нейронов (рис. 3, a 2). Площадь этих нейронов несколько больше в сегменте L4 (рис. 3, b 2).

На вентральной границе между пластинами VII, VIII и мотонейронными пулами (зона 4 на рис. 3, a) в сегментах L5–L7 выявлены средние по размеру (371 ± 58 мкм²) CR+ нейроны преимущественно овальной формы, по всем признакам схожие с клетками Реншоу (рис. 3, a 6). Размер сомы данных нейронов для всех сегментов одинаков (рис. 3, b 6).

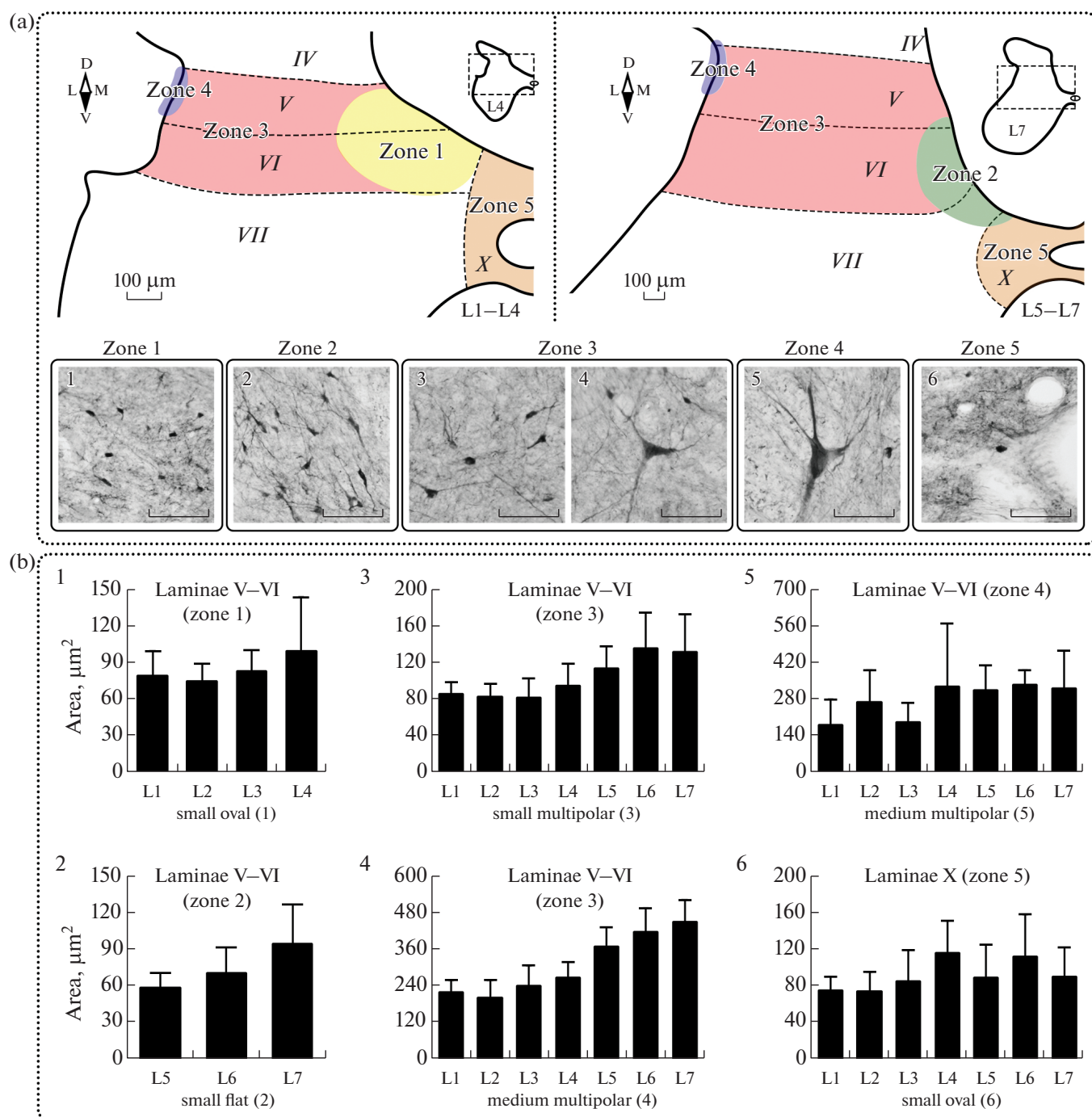


Рис. 2. Распределение CR⁺ нейронов в промежуточном сером веществе спинного мозга кошки. (а) — типы нейронов и их локализация: 1 — мелкие овальные нейроны ядер Кларка; 2 — мелкие плоские нейроны на границе пластин VI, VII и X в сегментах L5–L7; 3 — мелкие мультиполярные нейроны пластин V–VI; 4 — средние мультиполярные нейроны пластин V–VI; 5 — средние мультиполярные нейроны на латеральной границе между серым и белым веществом пластин V–VI; 6 — мелкие овальные нейроны пластины X. Черной штриховой линией обозначены границы пластин серого вещества. Римскими цифрами обозначены номера пластин. Разными цветами и арабскими цифрами обозначены зоны локализации нейронов. Латинскими буквами D, V, M, L обозначены стороны среза (соответственно, дорзальная, вентральная, медиальная, латеральная). Калибровочный маркер на всех изображениях равен 100 мкм. (б) — площадь CR⁺ нейронов разных морфотипов: 1 — мелких овальных нейронов ядер Кларка; 2 — площадь мелких плоских нейронов, локализованных в сегментах L5–L7 на границе пластин VI, VII и X; 3 — площадь мелких мультиполярных нейронов пластин V–VI; 4 — площадь средних мультиполярных нейронов пластин V–VI; 5 — площадь средних мультиполярных нейронов, локализованных на латеральной границе между серым и белым веществом пластин V–VI; 6 — площадь мелких овальных нейронов пластины X. Значения представлены как среднее + SD.

В остальной части пластин VII и VIII (зона 3 на рис. 3, а) локализуются мелкие, средние и крупные мультиполярные CR⁺ нейроны; нами не выявлено какой бы то ни было системности в их распределении.

Площадь сомы мелких мультиполярных клеток (рис. 3, а 3) составляет 173 ± 17 мкм². Достоверно значимых различий в площади нейронов во всех исследуемых сегментах не обнаружено (рис. 3, б 3).

Площадь сомы средних по размеру мультиполярных клеток (рис. 3, а 4) составляет 374 ± 31 мкм² и существенно не варьирует во всех исследуемых сегментах (рис. 3, б 4). Каждый нейрон имеет от 3 до 6 отростков.

Крупные мультиполярные (925 ± 74 мкм²) CR⁺ нейроны (рис. 3, а 5) имеют множество иммунопозитивных отростков. Площадь сомы существенно не варьирует, и в более ростральных сегментах (L1–L2) несколько меньше, чем в остальных (рис. 3, б 5). Некоторые клетки по своей морфологии напоминают альфа-мотонейроны, при этом обладают менее выраженной иммунопозитивной реакцией.

Пластина IX

В мотонейронных пулах CR⁺ нейронов не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день морфологическая классификация спинного мозга не полна, более того, отсутствует прямое соответствие между морфологической и функциональной классификациями. В соответствии с этим в обсуждении мы будем опираться на обе классификации: морфологическую и функциональную — для дорзальных рогов, и только на функциональную — для промежуточного серого вещества и вентральных рогов.

Пластина I

Нейроны пластины I обеспечивают проводниковую функцию различной кожной чувствительности (болевой, температурной, ощущения зуда) в супраспинальные структуры [33]. Выделяют 4 типа нейронов пластины I: веретеновидные, мультиполярные, плоские и пирамидные [34]. Известно, что разные морфотипы связаны с конкретным видом передаваемых сигналов [35].

В пластине I нами были выявлены 3 типа CR⁺ нейронов: 1) мелкие веретеновидные, 2) мелкие овальные, 3) средние мультиполярные (рис. 1, б).

Как видно из графика 1 на рис. 1, с, нейроны первого (веретеновидные) и второго (овальные) типа сходны по размерам. Учитывая и схожую зону

локализации этих клеток (зона 1 на рис. 1, б), мы не исключаем, что данные нейроны могут относиться к одному типу, вероятно, веретеновидных клеток, которые по-разному ориентированы в пространстве. В связи с этим данные клетки на срезах могут выглядеть веретеновидными или овальными без видимых отростков. В пользу этого факта говорят и литературные данные, согласно которым среди всех известных морфотипов нейронов пластины I у кошки [16] и крысы [5, 15] иммунопозитивны к CR только веретеновидные. Клетки данного морфотипа активируются болевыми сигналами в ответ на щипание кожи и/или ее нагрев [35] и экспрессируют ГАМК и динорфин [36].

Другой тип CR⁺ нейронов пластины I, выявленный в настоящем исследовании, представлен мультиполярными клетками (рис. 1, б 3). В работе [16] R. Anelli и C.J. Heckman, проанализировав у кошки популяцию CR⁺ нейронов пластины I сегмента L7, данный тип клеток отдельно не фиксируют (выделяют только веретеновидные), однако допускают, что выявленные ими круглые нейроны без иммунопозитивных отростков могут относиться к типу мультиполярных нейронов. Учитывая выявленную в нашем исследовании редкость данных нейронов (обнаружено 42 клетки на 210 срезах), полагаем в работе [16] мультиполярные нейроны с хорошо различимыми CR⁺ отростками могли отсутствовать на взятых в анализ срезах единственного исследованного сегмента L7. Функционально мультиполярные нейроны пластины I представлены достаточно широко [35], поэтому выявленные в настоящей работе мультиполярные нейроны могут быть унимодальными (специфически реагирующими на один из типов воздействия: холод, тепло, щипание, боль) или полимодальными. Среди медиаторов для данного морфотипа клеток характерна экспрессия ГАМК [36].

Пластина II

Основными функциями нейронов пластины II являются передача и модуляция соматосенсорной (болевой, тактильной и температурной) информации [33]. Согласно современной классификации нейронов, в пластине II выделяют 5 типов клеток: островковые, центральные, медио-латеральные, радиальные и вертикальные [37]. Главным морфологическим признаком для каждого типа нейронов является вид отхождения и ветвления дендритного дерева [38]. Как было показано в нашем исследовании, CR не выявляется в отростках нейронов пластины II, а форма сомы всех типов клеток схожа (рис. 1, б 4), поэтому при сопоставлении морфотипов мы можем полагаться только на преимущественную локализацию разных популяций нейронов в пределах пластины II. Из морфологического

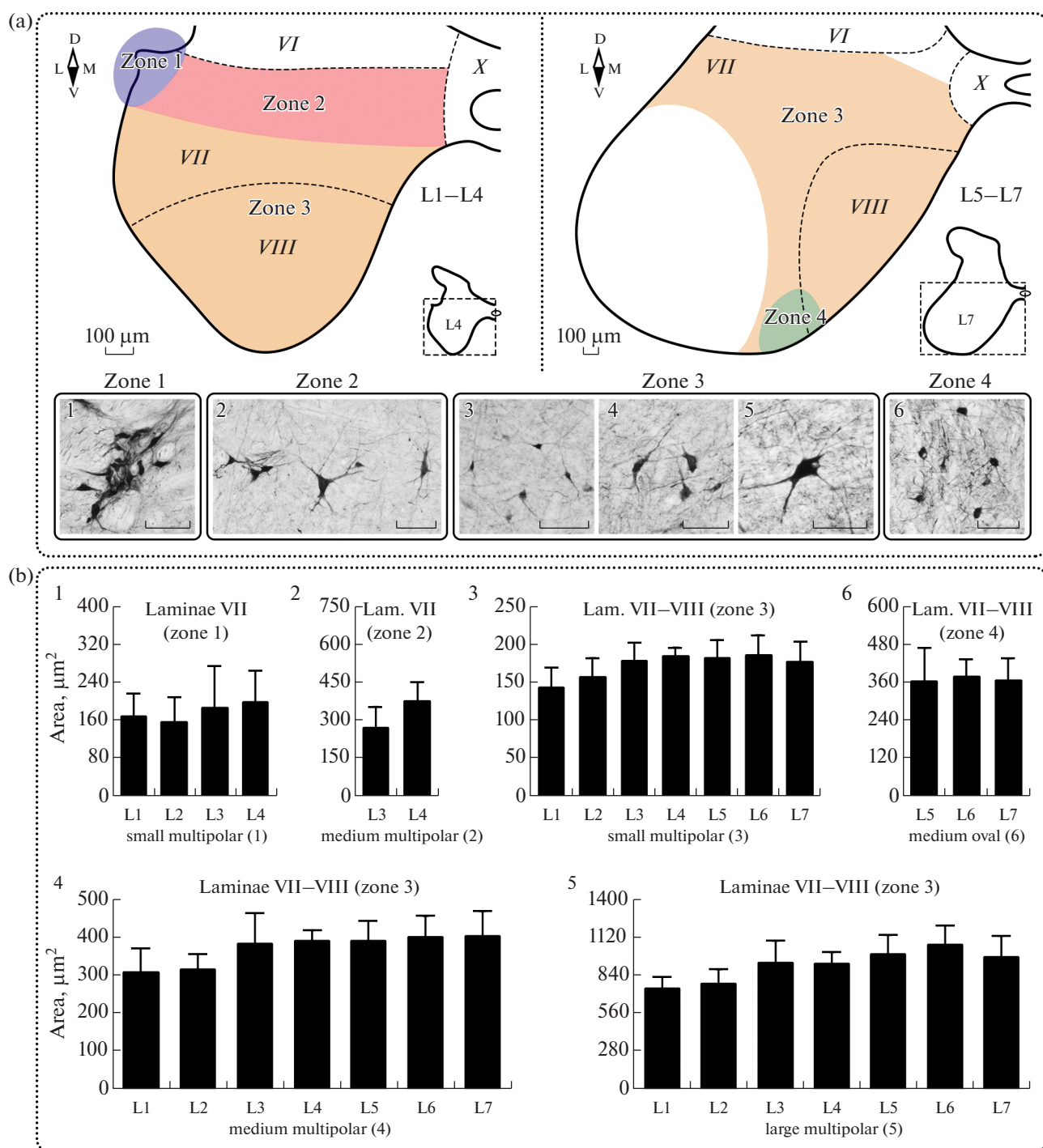


Рис. 3. Распределение CR⁺ нейронов в вентральном роге спинного мозга кошки. (а) — типы нейронов и их локализация: 1 — мелкие мультиполярные нейроны интермедиолатерального ядра (ИМЛ); 2 — средние мультиполярные нейроны на дорзальной границе пластины VII; 3 — мелкие мультиполярные нейроны пластин VII–VIII; 4 — средние мультиполярные нейроны пластин VII–VIII; 5 — крупные мультиполярные нейроны на вентральной границе между пластинами VII, VIII и мотонейронными пулами. Черной штриховой линией обозначены границы пластин серого вещества. Римскими цифрами обозначены номера пластин. Разными цветами и арабскими цифрами обозначены зоны локализации нейронов. Латинскими буквами D, V, M, L обозначены стороны среза (соответственно, дорзальная, вентральная, медиальная, латеральная). Калибровочный маркер на всех изображениях равен 100 мкм. (б) — площадь CR⁺ нейронов разных морфотипов: 1 — площадь мелких мультиполярных нейронов ИМЛ; 2 — площадь средних мультиполярных нейронов на дорзальной границе пластины VII; 3 — площадь мелких мультиполярных нейронов пластин VII–VIII; 4 — площадь средних мультиполярных нейронов пластин VII–VIII; 5 — площадь крупных мультиполярных нейронов пластин VII–VIII; 6 — площадь средних овальных нейронов на вентральной границе между пластинами VII, VIII и мотонейронными пулами. Значения представлены как среднее + SD.

описания клеток пластины II, представленного в работе [37], следует, что наибольшее сходство выявленные в нашем исследовании CR⁺ клетки имеют с центральными нейронами, располагающимися преимущественно во внутреннем слое пластины II. Данный тип клеток делится в свою очередь на тормозные (ГАМК-ергические) и возбуждающие (глутамат-ергические) [38], а иннервация обеспечивается С-волоками [39]. Некоторые центральные нейроны пластины II также экспрессируют кальбиндин [9], парвальбумин [5] и соматостатин [38].

Изучению функций CR⁺ нейронов пластины II посвящено множество современных работ. К.М. Smith и соавт., используя методы оптогенетики, выборочно активировали сети нейронов, экспрессирующих CR, и доказали их участие в инициации возбуждающих сигналов, напрямую передаваемых на пучковые нейроны пластины I, обеспечивая усиление болевой афферентации [40]. В работе [41] было показано, что CR⁺ нейроны пластины II участвуют в формировании аллодинии, вызванной в результате развития кожных воспалительных процессов. В исследовании G. Gatto и соавт. [42], посвященном картированию дорзальных рогов на предмет поиска интернейронов, участвующих в реализации разных рефлекторных реакций, было показано, что возбуждающие CR⁺ нейроны пластины II являются одним из типов клеток, обеспечивающих реализацию чесательного рефлекса.

Пластины III–IV

Пластины III и IV схожи между собой по цитоархитектонике и содержат пучковые и вставочные нейроны [41]. Пучковые нейроны принимают и обеспечивают дальнейшую передачу в супраспинальные структуры тактильных [43] и болевых сигналов [44]; вставочные нейроны представлены множеством популяций возбуждающих и тормозных клеток, участвующих в обработке механосенсорной информации и отличающихся по морфологическим, физиологическим и синаптическим свойствам [45].

В пластинках III–IV нами были выявлены три морфотипа CR⁺ нейронов: 1) мелкие веретеновидные, 2) мелкие мультиполярные, 3) средние мультиполярные (рис. 1, б).

Известно, что тактильная информация от механорецепторов поступает на клетки одного из подтипов пучковых клеток — вертикальные нейроны, описанные в работе [46]. Данные клетки по своей морфологии схожи с выявленными в нашем исследовании мелкими веретеновидными CR⁺ нейронами (рис. 1 б, 5). Нейроны двух других описанных морфотипов (мелкие и средние мультиполярные;

рис. 1, б 6; рис. 1, б 7) напоминают изученные М. Naim и соавт. пучковые клетки, обеспечивающие передачу болевой информации и аксоны которых участвуют в формировании спиноталамического тракта [47]. Однако эти клетки могут относиться и к одной из популяций тормозных интернейронов, коэкспрессирующих транскрипционный фактор PAX2 [41], необходимый для дифференциации ГАМК-ергических нейронов [48].

Пластины V–VI

На сегодняшний день не существует четкой морфологической классификации нейронов пластин V и VI, однако по функциям их разделяют на пучковые, propriospinalные и вставочные [33]. Создание данной классификации усложнено еще и тем, что обе пластины негомогенны и делятся на латеральную и медиальную части, которые имеют свои особенности для каждой из пластин [32].

В настоящей работе в пластинках V–VI выявлено 5 морфотипов CR⁺ нейронов: 1) мелкие овальные, 2) мелкие плоские, 3) средние мультиполярные, 4) мелкие мультиполярные, 5) крупные мультиполярные (рис. 2, а).

Мелкие овальные CR⁺ нейроны были визуализированы в ядрах Кларка (рис. 2, а 1), которые у кошки расположены в медиальной части пластины VI грудных и первых ростральных (L1–L4) поясничных сегментов [49]. Данные ядра относятся к propriоцептивной системе спинного мозга: в них сходятся сенсорные волокна Ia и II типа от мышечных веретен и Ib типа — от сухожилий, а также локализованы нейроны второго порядка, аксоны которых дают начало части дорзального спинно-мозжечкового тракта, передающего propriоцептивную информацию в мозжечок [50]. В ядрах Кларка выделяют три класса нейронов, хорошо различимых по размеру и форме: 1) мелкие (треугольные и мультиполярные), 2) средние (веретеновидные и мультиполярные), 2) крупные (мультиполярные) [51]. Учитывая размер выявленных в настоящем исследовании CR⁺ клеток, полагаем, они относятся к мелким или средним мультиполярным нейронам ядер Кларка. Данные клетки в силу своих размеров изучены значительно слабее класса крупных нейронов, аксоны которых дают начало спинно-мозжечковому тракту [52]. Предполагается, что более мелкие нейроны являются вставочными, имеющими локальные связи между собой, клетками других пластин (V, VI, VII и X) и афферентными волокнами [51, 52]. При этом стоит отметить, что у мышей CR экспрессируется у 40% нейронов, аксоны которых принимают участие в формировании дорзального спинно-мозжечкового тракта [53]. Y. Fu и соавт. не отмечают размер данных нейронов, поэтому мы можем предположить,

что некоторые мелкие/средние нейроны ядер Кларка являются не вставочными, а пучковыми, принимающими участие в формировании спинно-мозжечкового тракта.

В более каудальных поясничных сегментах (L5–L7) в аналогичных ядрах Кларка зонам серого вещества нами были выявлены мелкие плоские CR+ нейроны (рис. 2, а 2). Известно, что у грызунов [54, 55] и некоторых приматов [54, 56] помимо ранее описанных ядер Кларка в спинном мозге локализуются иные прецеребеллярные ядра, также являющиеся источником восходящих путей в мозжечок. У кошки за пределами анатомических границ ядер Кларка характерное для некоторых других видов поясничное прецеребеллярное ядро не визуализируется. В настоящем исследовании у кошки в сегментах L5–L7 в областях предположительной локализации поясничных прецеребеллярных ядер наблюдаются скопления CR+ нейронов, близких по морфологии к мелким овальным нейронам ядер Кларка. Мы полагаем, данные клетки могут являться составной частью проприоцептивной системы. В пользу данного предположения говорят результаты исследований, в которых указывается, что в обозначенных зонах локализуются интернейронные популяции, на клетки которых сходятся афференты I и II типа [57], а также локализуются нейроны, принимающие участие в формировании дорзального спинно-мозжечкового тракта, но не организованные в виде ядра [58].

На латеральной границе между серым и белым веществом пластины V, которая характеризуется наличием множества миелинизированных волокон и в результате чего имеет ретикулярный вид [32], выявлены средние мультиполярные CR+ нейроны (рис. 2, а 5). Такие же клетки описываются в другой работе на кошке [16], где отмечается, что данные нейроны не коэкспрессируют кальбиндин и парвальбумин. В исследованиях на крысе [5, 15], несмотря на описанное большое число CR+ нейронов в пластинах V–VI, не выявлен особый тип клеток на границе белого и серого вещества ни в одном из отделов спинного мозга. Ретикулярная часть латеральной половины пластины V у кошки характеризуется схождением висцеральных афферентов [59] и волокон от симпатических преганглионарных нейронов [60], а также локализацией мультирецептивных нейронов, реагирующих на болевые и тактильные стимулы [61].

В остальных областях пластин V–VI нами были выявлены дисперсно распределенные мелкие и средние мультиполярные CR+ нейроны (рис. 2, а 3; рис. 2, а 4). Данная зона характеризуется большим разнообразием функционально разнородных клеток [33]. У кошки в обозначенной зоне поясничных сегментов локализуются: 1) дорзальная часть популяции интернейронов, принимающих

участие в реализации олигосинаптического кожного рефлекса (в сегментах L4–S1) [62], 2) интернейроны, на которых сходятся окончания волокон, идущих от мышечных веретен по афферентам типа Ia [63] и 3) типа II (в сегментах L6–L7) [64]. Стоит отметить, что описанные интернейронные популяции представлены в пластинах V–VI лишь частично и в большей степени локализуются в пластине VII. Таким образом, некоторая часть популяции CR+ нейронов может быть задействована в работе локомоторных сетей, путем проецирования афферентной информации к соответствующим мотонейронным пулам. С другой стороны, пластины V–VI содержат множество пучковых и проприоспинальных нейронов [65], что свидетельствует о том, что приходящая проприоспинальная информация, помимо мотонейронных пулов, может поступать и на нейроны иных спинальных сегментов и супраспинальных структур.

Пластины VII–VIII

Большая часть серого вещества представлена пластинами VII и VIII, вариabельными по своим границам в разных сегментах и занимающими почти все пространство промежуточного серого вещества (за счет пластины VII) и вентральных рогов [32], в связи с чем данные пластины характеризуются большим морфологическим и функциональным разнообразием локализованных в них нейронов. Четкой классификации нейронов пластин VII–VIII, как и для пластин V–VI, на настоящий момент нет [33].

В боковых рогах сегментов L1–L4 на границе между пластинами VI и VII выявлены мелкие мультиполярные (реже овальные и плоские) CR+ нейроны. Данная зона в обозначенных сегментах у кошки характеризуется локализацией ИМЛ, состоящего из преганглионарных симпатических нейронов, отвечающих за контроль автономной деятельности внутренних органов [60]. Согласно работе [66], в зависимости от локализации нервных клеток и их морфотипа, ИМЛ делится на две зоны: 1) в сером веществе — *nucleus intermediolateralis pars principalis* и 2) в белом веществе — *nucleus intermediolateralis pars funicularis*. Судя по расположению выявленных нейронов и их морфологическому разнообразию, CR экспрессируется нейронами в обеих зонах ИМЛ, однако согласно исследованию [67] — не всеми. Помимо кошки, CR+ нейроны в ИМЛ описаны у крысы [5] и мarmозеток [56]. Нейроны ИМЛ синтезируют множество различных веществ: ацетилхолин, энкефалин, окситоцин, соматостатин и др. [33], однако работ, в которых была бы показана их коэкспрессия с CR, не обнаружено.

В сегментах L3–L4 вдоль дорзальной границы пластины VII выявлены пучки CR+ волокон и

средних мультиполярных нейронов, идущих между ядрами ИМЛ и ИММ. В данной зоне локализуется интеркалированное ядро, состоящее из преганглионарных симпатических нейронов [60]. Данное ядро локализуется у кошки в сегментах T1–L5 [68]. Учитывая выявленную в настоящем исследовании узкую зону локализации CR+ нейронов ИК, полагаем, в данном ядре CR экспрессируется строго определенной популяцией клеток, локализованных в сегментах L3–L4. Полагаем, этой популяцией могут выступать нейроны, описанные в исследовании [69], в котором было показано, что в промежуточном сером веществе медиальнее ИМЛ у кошки именно в сегментах L3–L4 локализуются симпатические преганглионарные нейроны, иннервирующие работу кишечника.

В каудальных поясничных сегментах (L5–L7) на границе пластин VII, VIII и X (мотонейронными пулами) выявлены средние по размеру CR+ нейроны овальной формы (рис. 3 а, б). Зона локализации данных нейронов совпадает с областью залегания интернейронов Реншоу, обеспечивающих посредством возвратного торможения механизм стабилизации частоты разрядки α -мотонейронов [70, 71]. Известно, что для многих видов млекопитающих в качестве маркера клеток Реншоу используется другой кальций-связывающий белок кальбиндин [8]. Однако данные клетки экспрессируют также парвальбумин и CR [7, 16]. При этом у кошки, в отличие от грызунов, только часть популяции клеток Реншоу экспрессирует кальбиндин (47%) [8], другая часть этой популяции коэкспрессирует CR и парвальбумин [16]. Предполагается, что кальций-связывающие белки могут в разных комбинациях экспрессироваться в отдельных популяциях клеток Реншоу, например, отличающихся по типу используемого медиатора (ГАМК или глицина) [16].

Остальные области пластин VII–VIII содержат в себе огромное число функционально разнородных нейронов: 1) пучковых — идущих к множеству супраспинальных структур [72], 2) проприоспинальных — соединяющих разные половины (комиссуральные) и сегменты спинного мозга [72, 73], 3) вставочных — на которых сходится супраспинальная и афферентная информация и пр. [74]. Все три типа мультиполярных CR+ нейронов в данных пластинах не имеют какой-либо конкретной локализации, кластеризации и других признаков, по которым можно было бы отнести их к конкретной функционально однородной популяции клеток. Полагаем, это станет возможным при использовании методов множественного иммуномечения.

Пластина IX

Пластина IX представлена главным образом мотонейронами. Известно, что у более примитивных

классов хордовых (рыб [75, 76], земноводных [77] и пресмыкающихся [78]) кальций-связывающие белки, в том числе и CR, экспрессируются соматическими мотонейронами. В настоящем исследовании в мотонейронах CR не был выявлен, что согласуется с данными, полученными на кошке [16] и других представителях млекопитающих: мышах [7], крысах [5, 15] и мармозетках [56].

Пластина X

По форме сомы в пластине X выделяют несколько типов нейронов: овальные, веретеновидные, пирамидные, звездчатые и мультиполярные [63]. На основе выполняемой функции определены по меньшей мере три класса нервных клеток: преганглионарные парасимпатические [79], пучковые [80] и участвующие в локомоторном контроле (в частности, модуляции работы мотонейронов) [81].

В настоящей работе в пластине X поясничных сегментов выявлены редкие мелкие овальные CR+ нейроны (рис. 2, а б). Наши данные согласуются с исследованиями на кошке [16] и крысе [5, 15], в которых также описаны мелкие и средние CR+ нейроны, лишенные иммунопозитивной реакции в отростках. При этом данные клетки не коэкспрессируют другие кальций-связывающие белки: кальбиндин и парвальбумин [16]. R. Anelli и C.J. Heckman [16] также отмечают затруднение в определении предполагаемой функции для данных нейронов в силу малого числа отличающих их морфологических признаков.

Согласно собственным данным на кошке [21] и литературным данным на крысе [5, 15], CR более широко представлен в пластине X в крестцовых сегментах (и в последних поясничных для крысы), где маркирует парасимпатические преганглионарные нейроны дорзальной серой комиссуры, расположенной над центральным каналом и обеспечивающей регуляцию деятельности тазовых органов [82]. Однако данные нейроны существенно отличаются по морфологии, локализации и числу от выявленных в настоящем исследовании CR+ нейронов пластины X поясничных сегментов и, по всей видимости, представляют собой отдельную популяцию CR+ нейронов.

Согласно полученным результатам, иммунопозитивные к кальретинину нейроны верхних пластин дорзальных рогов соответствуют определенным морфофункциональным типам: в пластине I — веретеновидным и мультиполярным нейронам, в пластинах II–III — центральным нейронам. Мы также обсуждаем соответствие между выявленными иммунопозитивными к кальретинину нейронами остальных пластин и функциональной классификацией нейронов спинного мозга. Настоящая работа является частью исследования, посвящен-

ного изучению морфофункциональной организации спинного мозга млекопитающих.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0006 (теоретическая часть) и гранта РНФ (№ 21-15-00235) (экспериментальная часть).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента: Н.С. Меркульева, П.Е. Мусиенко; подготовка гистологического материала: Н.С. Меркульева, А.А. Вещицкий; сбор и обработка данных: А.А. Вещицкий; написание и редактирование манускрипта А.А. Вещицкий, Н.С. Меркульева, П.Е. Мусиенко.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Н.С. Павловой и П.Ю. Шкорбатовой за помощь в проведении перфузии и диссекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Islam Md.S.* (2020) Calcium Signaling: From Basic to Bedside. In: *Islam MdS* (ed) Calcium Signaling. Springer International Publishing, Cham, pp 1–6.
2. *Schwaller B.* (2009) The continuing disappearance of “pure” Ca^{2+} buffers. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 275–300.
<https://doi.org/10.1007/s00018-008-8564-6>
3. *Antal M., Freund T.F., Polgár E.* (1990) Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin-D 28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: A light and electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology* 295: 467–484.
4. *Walters M.C., Sonner M.J., Myers J.H., Ladle D.R.* (2019) Calcium imaging of parvalbumin neurons in the dorsal root ganglia. *eNeuro* 6:.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0349-18.2019>
5. *Ren K., Ruda M.A.* (1994) A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. *Brain Research Reviews* 19: 163–179.
[https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)90010-8)
6. *Hantman A.W., Jessell T.M.* (2010) Clarke’s column neurons as the focus of a corticospinal corollary circuit. *Nature Neuroscience* 13: 1233–1239.
<https://doi.org/10.1038/nn.2637>
7. *Alvarez F.J., Jonas P.C., Sapir T., Hartley R., Berrocal M.C., Geiman E.J., Todd A.J., Goulding M.* (2005) Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons. *Journal of Comparative Neurology* 493: 177–192.
<https://doi.org/10.1002/cne.20711>
8. *Carr P.A., Alvarez F.J., Leman E.A., W. Fyffe R.E.* (1998) Calbindin D28k expression in immunohistochemically identified Renshaw cells. *NeuroReport* 9: 2657–2661.
<https://doi.org/10.1097/00001756-199808030-00043>
9. *Merkulyeva N., Veshchitskii A., Makarov F., Gerasimenko Y., Musienko P.* (2016) Distribution of 28 kDa calbindin-Immunopositive neurons in the cat spinal cord. *Frontiers in Neuroanatomy* 9: 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00166>
10. *Grkovic I., Anderson C.R.* (1997) Calbindin D28K-immunoreactivity identifies distinct subpopulations of sympathetic pre- and postganglionic neurons in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 386: 245–259.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970922\)386:2<245::AID-CNE6>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970922)386:2<245::AID-CNE6>3.0.CO;2-1)
11. *Strack S., Wadzinski B.E., Ebner F.F.* (1996) Localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the hindbrain and spinal cord of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 375: 66–76.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961104\)375:1<66::AID-CNE4>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961104)375:1<66::AID-CNE4>3.0.CO;2-M)
12. *Wonders C.P., Anderson S.A.* (2006) The origin and specification of cortical interneurons. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 687–696.
<https://doi.org/10.1038/nrn1954>
13. *Winsky L., Kuźnicki J.* (1995) Distribution of calretinin, calbindin D28k, and parvalbumin in subcellular fractions of rat cerebellum: effects of calcium. *Journal of Neurochemistry* 65: 381–388.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65010381.x>
14. *Münkle M.C., Waldvogel H.J., Faull R.L.M.* (2000) The distribution of calbindin, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the human thalamus. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 19: 155–173.
[https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(00\)00060-0](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(00)00060-0)
15. *Ren K., Ruda M.A., Jacobowitz D.M.* (1993) Immunohistochemical localization of calretinin in the dorsal root ganglion and spinal cord of the rat. *Brain Research Bulletin* 31: 13–22.
[https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90004-U](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90004-U)
16. *Anelli R., Heckman C.J.* (2005) The calcium binding proteins calbindin, parvalbumin, and calretinin have specific patterns of expression in the gray matter of cat spinal cord. *Journal of Neurocytology* 34: 369–385.
<https://doi.org/10.1007/s11068-006-8724-2>
17. *Camp A.J., Wijesinghe R.* (2009) Calretinin: Modulator of neuronal excitability. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 2118–2121.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.05.007>

18. *Gerasimenko Y., Roy R.R., Edgerton V.R.* (2008) Epidural stimulation: Comparison of the spinal circuits that generate and control locomotion in rats, cats and humans. *Experimental Neurology* 209: 417–425.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.07.015>
19. *Musienko P., Courtine G., Tibbs J.E., Kilimnik V., Savochin A., Garfinkel A., Roy R.R., Edgerton V.R., Gerasimenko Y.* (2012) Somatosensory control of balance during locomotion in decerebrate cat. *Journal of Neurophysiology* 107: 2072–2082.
<https://doi.org/10.1152/jn.00730.2011>
20. *Edgerton V.R., Courtine G., Gerasimenko Y.P., Lavrov I., Ichiyama R.M., Fong A.J., Cai L.L., Otsoshi C.K., Tillakaratne N.J.K., Burdick J.W., Roy R.R.* (2008) Training locomotor networks. *Brain Research Reviews* 57: 241–254.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.09.002>
21. *Merkulyeva N., Lyakhovetskii V., Veshchitskii A., Bazhenova E., Gorskii O., Musienko P.* (2019) Activation of the spinal neuronal network responsible for visceral control during locomotion. *Experimental Neurology* 320: 112986.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.112986>
22. *Fairless R., Williams S.K., Diem R.* (2019) Calcium-binding proteins as determinants of central nervous system neuronal vulnerability to disease. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 2146.
<https://doi.org/10.3390/ijms20092146>
23. *Morrison B.M., Janssen W.G.M., Gordon J.W., Morrison J.H.* (1998) Light and electron microscopic distribution of the AMPA receptor subunit, GluR2, in the spinal cord of control and G86R mutant superoxide dismutase transgenic mice. *Journal of Comparative Neurology* 395: 523–534.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980615\)395:4<523::AID-CNE8>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980615)395:4<523::AID-CNE8>3.0.CO;2-3)
24. *Merkulyeva N., Veshchitskii A., Gorsky O., Pavlova N., Zelenin P.V., Gerasimenko Y., Deliagina T.G., Musienko P.* (2018) Distribution of spinal neuronal networks controlling forward and backward locomotion. *The Journal of Neuroscience* 38: 4695–4707.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2951-17.2018>
25. *Merkulyeva N., Lyakhovetskii V., Veshchitskii A., Gorskii O., Musienko P.* (2021) Rostrocaudal distribution of the C-Fos-immunopositive spinal network defined by muscle activity during locomotion. *Brain Sciences* 11: 69.
<https://doi.org/10.3390/brainsci11010069>
26. *Zhang M., Broman J.* (1998) Cervicothalamic tract termination: a reexamination and comparison with the distribution of monoclonal antibody Cat-301 immunoreactivity in the cat. *Anatomy and Embryology* 198: 451–472.
<https://doi.org/10.1007/s004290050196>
27. *Shkorbatova P.Y., Lyakhovetskii V.A., Merkulyeva N.S., Veshchitskii A.A., Bazhenova E.Y., Laurens J., Pavlova N.V., Musienko P.E.* (2019) Prediction algorithm of the cat spinal segments lengths and positions in relation to the vertebrae. *The Anatomical Record* 302: 1628–1637.
<https://doi.org/10.1002/ar.24054>
28. *Eldred W.D., Zucker C., Karten H.J., Yazulla S.* (1983) Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 31: 285–292.
<https://doi.org/10.1177/31.2.6339606>
29. *Rogers J.H.* (1987) Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *Journal of Cell Biology* 105: 1343–1353.
<https://doi.org/10.1083/jcb.105.3.1343>
30. *Andressen C., Blümcke I., Celio M.R.* (1993) Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell and Tissue Research* 271: 181–208.
<https://doi.org/10.1007/BF00318606>
31. *Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9: 676–682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
32. *Rexed B.* (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology* 100: 297–379.
<https://doi.org/10.1002/cne.901000205>
33. *Heise C., Kayalioglu G.* (2009) Cytoarchitecture of the Spinal Cord. In: *Watson C., Paxinos G., Kayalioglu G.* (eds) *The Spinal Cord*. Academic Press, San Diego, pp. 64–93.
34. *Craig A.D., Zhang E.T., Blomqvist A.* (2002) Association of spinothalamic lamina I neurons and their ascending axons with calbindin-immunoreactivity in monkey and human. *PAIN* 97: 105–115.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(02\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(02)00009-X)
35. *Han Z.-S., Zhang E.-T., Craig A.D.* (1998) Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nature Neuroscience* 1: 218–225.
<https://doi.org/10.1038/665>
36. *Lima D., Avelino A., Coimbra A.* (1993) Morphological characterization of marginal (Lamina I) neurons immunoreactive for substance P, enkephalin, dynorphin and gamma-aminobutyric acid in the rat spinal cord. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 6: 43–52.
[https://doi.org/10.1016/0891-0618\(93\)90006-P](https://doi.org/10.1016/0891-0618(93)90006-P)
37. *Grudt T.J., Perl E.R.* (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *The Journal of Physiology* 540: 189–207.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.012890>
38. *Yasaka T., Tiong S.Y.X., Hughes D.I., Riddell J.S., Todd A.J.* (2010) Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151: 475–488.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.08.008>

39. Todd A.J. (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience* 11: 823–836.
<https://doi.org/10.1038/nrn2947>
40. Smith K.M., Browne T.J., Davis O.C., Coyle A., Boyle K.A., Watanabe M., Dickinson S.A., Iredale J.A., Gradwell M.A., Jobling P., Callister R.J., Dayas C.V., Hughes D.I., Graham B.A. (2019) Calretinin positive neurons form an excitatory amplifier network in the spinal cord dorsal horn. *eLife* 8: e49190.
<https://doi.org/10.7554/eLife.49190>
41. Peirs C., Williams S.-P.G., Zhao X., Arokiaaraj C.M., Ferreira D.W., Noh M., Smith K.M., Halder P., Corrigan K.A., Gedeon J.Y., Lee S.J., Gatto G., Chi D., Ross S.E., Goulding M., Seal R.P. (2021) Mechanical allodynia circuitry in the dorsal horn is defined by the nature of the Injury. *Neuron* 109: 73–90.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.10.027>
42. Gatto G., Bourane S., Ren X., Di Costanzo S., Fenton P.K., Halder P., Seal R.P., Goulding M.D. (2021) A functional topographic map for spinal sensorimotor reflexes. *Neuron* 109: 91–104.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.10.003>
43. Willis W.D., Coggeshall R.E. (2004) Functional Organization of Dorsal Horn Interneurons. In: Willis W.D., Coggeshall R.E. (eds) *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord: Volume 1 Primary Afferent Neurons and the Spinal Dorsal Horn*. Springer US, Boston, MA, pp 271–388.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0035-3_7
44. Al-Khater K.M., Todd A.J. (2009) Collateral projections of neurons in laminae I, III, and IV of rat spinal cord to thalamus, periaqueductal gray matter, and lateral parabrachial area. *Journal of Comparative Neurology* 515: 629–646.
<https://doi.org/10.1002/cne.22081>
45. Abaira V.E., Kuehn E.D., Chirila A.M., Springel M.W., Toliver A.A., Zimmerman A.L., Orefice L.L., Boyle K.A., Bai L., Song B.J., Bashista K.A., O'Neill T.G., Zhuo J., Tsan C., Hoynoski J., Rutlin M., Kus L., Niederkofler V., Watanabe M., Dymecki S.M., Nelson S.B., Heintz N., Hughes D.I., Ginty D.D. (2017) The cellular and synaptic architecture of the mechanosensory dorsal horn. *Cell* 168: 295–310.e19.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.010>
46. Maxwell D.J., Fyffe R.E.W., Rethelyi M. (1983) Morphological properties of physiologically characterized lamina III neurones in the cat spinal cord. *Neuroscience* 10: 1–22.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90076-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90076-3)
47. Naim M., Spike R.C., Watt C., Shehab S.A.S., Todd A.J. (1997) Cells in laminae III and IV of the rat spinal cord that possess the Neurokinin-1 receptor and have dorsally directed dendrites receive a major synaptic input from tachykinin-containing primary afferents. *Journal of Neuroscience* 17: 5536–5548.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05536.1997>
48. Larsson M. (2017) Pax2 is persistently expressed by GABAergic neurons throughout the adult rat dorsal horn. *Neuroscience Letters* 638: 96–101.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.015>
49. Merkul'eva N.S., Veshchitskii A.A., Shkorbatova P.Yu., Shenkman B.S., Musienko P.E., Makarov F.N. (2017) Morphometric characteristics of the dorsal nuclei of Clarke in the rostral segments of the lumbar part of the spinal cord on cats. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 47: 851–856.
<https://doi.org/10.1007/s11055-017-0481-4>
50. Vega J.A., Cobo J. (2021) Structural and biological basis for proprioception. *Proprioception*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.96787>
51. Loewy A.D. (1970) A study of neuronal types in Clarke's column in the adult cat. *Journal of Comparative Neurology* 139: 53–79.
<https://doi.org/10.1002/cne.901390104>
52. Burke R.E., Rudomin P. (2011) Spinal neurons and synapses. In: *Comprehensive physiology*. American cancer society, pp 877–944.
<https://doi.org/10.1002/cphy.cp010124>
53. Fu Y., Sengul G., Paxinos G., Watson C. (2012) The spinal precerebellar nuclei: Calcium binding proteins and gene expression profile in the mouse. *Neuroscience Letters* 518: 161–166.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.05.002>
54. Snyder R.L., Faull R.L.M., Mehler W.R. (1978) A comparative study of the neurons of origin of the spinocerebellar afferents in the rat, Cat and squirrel monkey based on the retrograde transport of horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology* 181: 833–852.
<https://doi.org/10.1002/cne.901810409>
55. Olude M.A., Idowu A.O., Mustapha O.A., Olopade J.O., Akinloye A.K. (2015) Spinal cord studies in the African Giant Rat (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse). *Nigerian journal of physiological sciences* 30: 25–32
56. Watson C., Sengul G., Tanaka I., Rusznak Z., Tokuno H. (2015) The spinal cord of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuroscience Research* 93: 164–175.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.12.012>
57. Hongo T., Jankowska E., Ohno T., Sasaki S., Yamashita M., Yoshida K. (1983) The same interneurons mediate inhibition of dorsal spinocerebellar tract cells and lumbar motoneurons in the cat. *The Journal of Physiology* 342: 161–180.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014845>
58. Matsushita M., Hosoya Y., Ikeda M. (1979) Anatomical organization of the spinocerebellar system in the cat, as studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology* 184: 81–105.
<https://doi.org/10.1002/cne.901840106>
59. Kuo D.C., Nadelhaft I., Hisamitsu T., Groat W.C. de (1983) Segmental distribution and central projection of renal afferent fibers in the cat studied by transganglionic

- transport of horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology* 216: 162–174.
<https://doi.org/10.1002/cne.902160205>
60. *Morgan C., Groat W.C. de, Nadelhaft I.* (1986) The spinal distribution of sympathetic preganglionic and visceral primary afferent neurons that send axons into the hypogastric nerves of the cat. *Journal of Comparative Neurology* 243: 23–40.
<https://doi.org/10.1002/cne.902430104>
 61. *Ritz L.A., Greenspan J.D.* (1985) Morphological features of lamina V neurons receiving nociceptive input in cat sacrocaudal spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* 238: 440–452.
<https://doi.org/10.1002/cne.902380408>
 62. *Moschovakis A.K., Solodkin M., Burke R.E.* (1992) Anatomical and physiological study of interneurons in an oligosynaptic cutaneous reflex pathway in the cat hindlimb. *Brain Research* 586: 311–318.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91641-Q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91641-Q)
 63. *Brown A.G., Fyffe R.E.* (1978) The morphology of group Ia afferent fibre collaterals in the spinal cord of the cat. *The Journal of Physiology* 274: 111–127.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1978.sp012137>
 64. *Riddell J.S., Hadian M.* (2000) Interneurons in pathways from group II muscle afferents in the lower–Lumbar segments of the feline spinal cord. *The Journal of Physiology* 522: 109–123.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00109.xm>
 65. *Molenaar I., Kuypers H.G.J.M.* (1978) Cells of origin of propriospinal fibers and of fibers ascending to supraspinal levels. A HRP study in cat and rhesus monkey. *Brain Research* 152: 429–450.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)91102-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)91102-2)
 66. *Deuschl G., Illert M.* (1981) Cytoarchitectonic organization of lumbar preganglionic sympathetic neurons in the cat. *Journal of the Autonomic Nervous System* 3: 193–213.
[https://doi.org/10.1016/0165-1838\(81\)90063-1](https://doi.org/10.1016/0165-1838(81)90063-1)
 67. *Edwards S.L., Anderson C.R., Southwell B.R., McAllen R.M.* (1996) Distinct preganglionic neurons innervate nor-adrenaline and adrenaline cells in the cat adrenal medulla. *Neuroscience* 70: 825–832.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)83019-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)83019-3)
 68. *Anderson C.R., Keast J.R., McLachlan E.M.* (2009) Spinal Autonomic Preganglionic Neurons: the visceral efferent system of the spinal cord. In: *Watson C., Paxinos G., Kayalioglu G.* (eds) *The Spinal Cord*. Academic Press, San Diego, pp 115–129
 69. *Baron R., Janig W., McLachlan E.M.* (1985) The afferent and sympathetic components of the lumbar spinal outflow to the colon and pelvic organs in the cat. III. The colonic nerves, incorporating an analysis of all components of the lumbar prevertebral outflow. *Journal of Comparative Neurology* 238: 158–168.
<https://doi.org/10.1002/cne.902380204>
 70. *Renshaw B.* (1946) Central effects of centripetal impulses in axons of spinal ventral roots. *Journal of Neurophysiology* 9: 191–204.
<https://doi.org/10.1152/jn.1946.9.3.191>
 71. *Alvarez F.J., Benito-Gonzalez A., Siembab V.C.* (2013) Principles of interneuron development learned from Renshaw cells and the motoneuron recurrent inhibitory circuit. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1279: 22–31.
<https://doi.org/10.1111/nyas.12084>
 72. *Matsushita M.* (1999) Projections from the lowest lumbar and sacral-caudal segments to the cerebellar nuclei in the rat, studied by anterograde axonal tracing. *Journal of Comparative Neurology* 404: 21–32.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990201\)404:1<21::AID-CNE2>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990201)404:1<21::AID-CNE2>3.0.CO;2-7)
 73. *Moran-Rivard L., Kagawa T., Saueressig H., Gross M.K., Burrill J., Goulding M.* (2001) Evx1 Is a postmitotic determinant of V0 interneuron identity in the spinal cord. *Neuron* 29: 385–399.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00213-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00213-6)
 74. *Jankowska E.* (2013) Spinal Interneurons. In: *Pfaff DW* (ed) *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*. Springer, New York, NY, pp 1063–1099.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.248740>
 75. *Morona R., Northcutt R.G., González A.* (2010) Immunohistochemical localization of calbindin-D28k and calretinin in the spinal cord of Lungfishes. *Brain, Behavior and Evolution* 76: 198–210.
<https://doi.org/10.1159/000321326>
 76. *Berg E.M., Bertuzzi M., Ampatzis K.* (2018) Complementary expression of calcium binding proteins delineates the functional organization of the locomotor network. *Brain Structure and Function* 223: 2181–2196.
<https://doi.org/10.1007/s00429-018-1622-4>
 77. *Morona R., Moreno N., López J.M., González A.* (2006) Immunohistochemical localization of calbindin-D28k and calretinin in the spinal cord of *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Neurology* 494: 763–783.
<https://doi.org/10.1002/cne.20836>
 78. *Morona R., López J.M., González A.* (2006) Calbindin-D28k and calretinin immunoreactivity in the spinal cord of the lizard Gekko gekko: Colocalization with choline acetyltransferase and nitric oxide synthase. *Brain Research Bulletin* 69: 519–534.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.02.022>
 79. *Deuchars S.A., Lall V.K.* (2015) Sympathetic preganglionic neurons: properties and inputs. *Comprehensive Physiology* 5: 829–869.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c140020>
 80. *Kayalioglu G., Robertson B., Kristensson K., Grant G.* (1999) Nitric oxide synthase and interferon-gamma receptor immunoreactivities in relation to ascending spinal pathways to thalamus, hypothalamus, and the periaque-

- ductal grey in the rat. *Somatosensory & Motor Research* 16: 280–290.
<https://doi.org/10.1080/08990229970348>
81. *Bertrand S., Cazalets J.-R.* (2002) The respective contribution of lumbar segments to the generation of locomotion in the isolated spinal cord of newborn rat. *European Journal of Neuroscience* 16: 1741–1750.
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02233.x>
82. *De Groat W.C., Yoshimura N.* (2010) Changes in afferent activity after spinal cord injury. *Neurourology and Urodynamics* 29: 63–76.
<https://doi.org/10.1002/nau.20761>

DISTRIBUTION OF CALRETININ-IMMUNOPOSITIVE NEURONS IN THE CAT LUMBAR SPINAL CORD

A. A. Veshchitskii^a, P. E. Musienko^{a,b,c}, and N. S. Merkulyeva^{a,#}

^a *Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b *Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^c *Children's Surgery and Orthopedics Clinic, Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: mer-natalia@yandex.ru*

A variety of neural networks in the central nervous system is determined by the heterogeneity of its constituent neuronal populations. Calcium-binding proteins can be used as markers of different neuronal morphotypes. One of the most common calcium-binding proteins in the nervous system is calretinin. In the present work, using an indirect immunohistochemical method, calretinin-immunopositive neuronal populations were labeled in lumbar segments of the cat (*Felis catus*) spinal cord. We identified nineteen morphotypes of neurons with strictly segmental and laminar distribution patterns, and attempted to compare putative functions of these neurons with the available literature data. Three morphotypes are located in lamina I, corresponding to neurons involved in the transmission of nociceptive and temperature information. Lamina II contains neurons of a single morphotype, on which nociceptive afferents converge. Laminae III–IV comprise three types of projection neurons transmitting information from peripheral mechanoreceptors and nociceptors to supraspinal structures. Laminae V–VI are characterized by functionally different neurons of five morphotypes: two types of interneurons localized to the Clarke's column and analogous zone of the caudal lumbar segments, which collect proprioceptive information; one type of neurons located at the lateral interface between the white and gray matters and responding to pain and tactile signals; and two types of irregularly distributed interneurons (projection or propriospinal neurons) that receive heterogeneous afferent signals from muscle spindles. In laminae VII–VIII, there are two types of sympathetic preganglionic neurons (in the intermediolateral and intercalated nuclei), Renshaw interneurons, and three types of multi-sized dispersedly distributed multipolar cells with unidentified functions. No calretinin-immunopositive neurons were found in lamina IX represented by motoneuron pools. In lamina X, sparse neurons reside around the central canal; their function is also obscure due to the paucity of morphological characters.

Keywords: calcium-binding proteins, calretinin, spinal cord, mapping, cat