

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Обзорные и проблемные статьи

- Механизмы физиологического и нейротоксического действия гипербарического кислорода
И. Т. Демченко, С. Ю. Жилиев, Т. Ф. Платонова, О. С. Алексеева 1243
-

Экспериментальные статьи

- Коррекция поведенческих нарушений и состояния микроглии рекомбинантным антагонистом рецептора IL-1 при экспериментальной черепно-мозговой травме
Е. Е. Фомичева, С. Н. Шанин, Т. А. Филатенкова, Н. С. Новикова, А. С. Дятлова, А. М. Ищенко, Н. Б. Серебряная 1264
- Особенности экспрессии регулятора стресса эндоплазматического ретикулума XBP1 в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани у крыс линии Вистар в условиях хронического стресса
И. А. Топол, И. С. Полякова, А. В. Елыкова, А. М. Камышный 1279
- Длительная постоянная темнота модулирует возрастные изменения уровня α -токоферола у крыс
И. В. Башишникова, Т. Н. Ильина, Е. А. Хижкин, В. А. Илюха 1291
- Выполнение произвольных движений в условиях активации системы произвольного внимания
В. М. Князева, А. М. Плакхин, А. А. Александров 1305
- Регистрация изменений уровня внеклеточного дофамина в прилежащем ядре методом быстросканирующей циклической вольтамперометрии при стимуляции зоны вентральной области покрышки, раздражение которой вызывает и реакцию самостимуляции
С. С. Пюрвеев, В. В. Сизов, А. А. Лебедев, Е. Р. Бычков, В. Н. Мухин, А. В. Дробленков, П. Д. Шабанов 1316
- Влияние нефрэктомии на вызванное электростимуляцией изменение тонуса артерий нормотензивных и спонтанно гипертензивных крыс
В. Н. Ярцев 1329
- Электрическая активность сердца крыс в период реполяризации желудочков после однократного бега на тредбане до отказа
А. Г. Ивонин, С. Л. Смирнова, И. М. Рощевская 1340
- Экспрессия c-Fos в клетках продолговатого мозга крыс после субдиафрагмальной ваготомии и введения антигенов различной природы
А. С. Дятлова, О. Л. Коченда, Н. В. Лавров, Е. А. Корнева 1353
- Сравнительное исследование поведения в водном лабиринте Морриса крыс линии Wistar, длительно потребляющих этанол, и крыс-гетерозигот по нокауту гена дофаминавого транспортера DAT
Е. В. Филатова, Г. Е. Громова, М. В. Дорофейкова, И. В. Антонова, А. Ю. Егоров 1365
-

Методические статьи

Тест-система для контроля генетической чистоты трансгенных линий мышей,
экспрессирующих биосенсоры хлора и водорода

Ю. Н. Давидюк, А. Х. Юсупова, Е. О. Петухова, П. Д. Брежестовский

1379

CONTENTS

Reviews

- Mechanisms of Physiological and Neurotoxic Action of Hyperbaric Oxygen
I. T. Demchenko, S. Yu. Zhilyaev, T. F. Platonova, and O. S. Alekseeva 1243
-

Experimental Articles

- Correction of Behavioral Disorders and State of Microglia with a Recombinant IL-1 Receptor Antagonist in Experimental Traumatic Brain Injury
E. E. Fomicheva, S. N. Shanin, T. A. Filatenkova, N. S. Novikova, A. S. Dyatlova, A. M. Ishchenko, and N. B. Serebryanaya 1264
- Peculiarities of Endoplasmic Reticulum Stress Regulator XBP1 Expression in the Gut-Associated Lymphoid Tissue of Wistar Rats under Chronic Stress
I. A. Topol, I. S. Polyakova, A. V. Elykova, and A. M. Kamyshny 1279
- Prolonged Light Deprivation Modulates the Age-Related Changes in α -Tocopherol Level in Rats
I. V. Baishnikova, T. N. Ilyina, E. A. Khizhkin, and V. A. Ilyukha 1291
- Voluntary Movements Performance during the Involuntary Attention Activation
V. M. Knyazeva, A. M. Plakchin, and A. A. Aleksandrov 1305
- Registration of Changes in the Level of Extracellular Dopamine in the Nucleus Accumbens by Fast-Scan Cyclic Voltammetry during Stimulation of the Zone of the Ventral Tegmental Area, which Also Caused a Self-Stimulation
S. S. Pyurveev, V. V. Sizov, A. A. Lebedev, E. R. Bychkov, V. N. Mukhin, A. V. Droblenkoy, and P. D. Shabanov 1316
- Effects of Nephrectomy on the Electrical Field Stimulation-Evoked Changes in Tone of Arteries from the Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats
V. N. Yartsev 1329
- Heart Electrical Activity during Ventricular Repolarization in Rats after Acute Exhaustive Treadmill Running
A. G. Ivonin, S. L. Smirnova, and I. M. Roshchevskaya 1340
- c-Fos Expression in Rat Medulla Oblongata after Subdiaphragmatic Vagotomy and Various Antigens Administration
A. S. Diatlova, O. L. Kochenda, N. V. Lavrov, and E. A. Korneva 1353
- Comparative Study of the Behavior after Long-Term Ethanol Consumption Wistar Rats and Dopamine Transporter Heterozygous Rats in the Morris Water Maze
E. V. Filatova, G. E. Gromova, M. V. Dorofeikova, I. V. Antonova, and A. Y. Egorov 1365
-

Methodical Articles

- A Test System for Monitoring the Genetic Purity of Transgenic Mice Lines Expressing Chloride and Hydrogen Biosensors
Y. N. Davidyuk, A. Kh. Yusupova, E. O. Petukhova, and P. D. Bregestovski 1379
-
-

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МЕХАНИЗМЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО И НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО
ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРБАРИЧЕСКОГО КИСЛОРОДА

© 2022 г. И. Т. Демченко¹, С. Ю. Жилев¹, Т. Ф. Платонова¹, О. С. Алексеева¹ *

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

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

Поступила в редакцию 30.06.2022 г.
После доработки 25.08.2022 г.
Принята к публикации 29.08.2022 г.

За период использования гипербарического кислорода в лечебной медицине и при подводных погружениях накоплены обширные знания о механизмах его биологического действия. В настоящей работе анализируются экспериментальные данные последних лет, относящиеся к клеточным и молекулярным механизмам физиологического и нейротоксического действия гипербарического кислорода. Новые данные о физиологическом действии гипербарического кислорода касаются механизмов гипероксической вазоконстрикции и активации барорефлекса в гипероксии. Токсическое действие гипербарического кислорода реализуется через интенсивную продукцию реактивных форм кислорода и азота, которые вызывают посттрансляционную модификацию белков, отвечающих за электрогенез нейронов и синаптическую передачу в ГАМК-ергической системе головного мозга.

Ключевые слова: гипербарический кислород, реактивные формы кислорода и азота, гипероксическая вазоконстрикция, гипероксический барорефлекс, кислородные судороги, ГАМК-ергическая система мозга

DOI: 10.31857/S0869813922100041

Чистый кислород (~100% O₂) под давлением выше атмосферного (гипербарический кислород или ГБО₂) является техногенным фактором, который не встречается в природе, а используется для дыхания человека при решении множества медицинских и хозяйственных задач. Широкие потребности в ГБО₂ для лечебной медицины и при подводных погружениях предопределили необходимость изучения механизмов его действия на организм человека с целью создания безопасных и эффективных технологий применения. За последние десятилетия накоплены обширные знания о механизмах биологического действия ГБО₂, которые условно можно разделить на две части. Первую группу составляют данные об интегративных физиологических, биохимических и патологических реакциях организма человека и животных на экстремальную гипероксию. Подавляющая часть этих данных касается реакций ЦНС, сердечно-сосудистой и дыхательной систем на гипербарическую гипероксию, а также изменений в системе крови и окислительном метаболизме в гипероксической среде. Патологические реакции на действие ГБО₂ касаются в основном токсического действия ГБО₂ на ЦНС и легкие. Интегративные физиологи-

ческие и патологические реакции в ответ на дыхание ГБО_2 имеют описательный характер и не раскрывают базисных (молекулярных) механизмов их реализации.

Вторую группу знаний составляют данные о молекулярных механизмах биологического действия ГБО_2 , которые накапливаются с конца прошлого столетия. Появление этой группы связано развитием молекулярной биологии, при этом важным моментом является признание ключевой роли свободных радикалов кислорода и азота в реализации механизмов биологического действия кислорода под давлением. В данном кратком обзоре будут рассмотрены современные представления о путях и механизмах реализации физиологических и нейротоксических реакций организма на действие ГБО_2 , которые обобщены нами в виде гипотетической схемы (рис. 1). Отдельные элементы схемы и взаимодействие между ними будут объяснены по ходу изложения настоящего обзора. Основное внимание будет уделено механизмам вовлечения свободных радикалов кислорода и азота в реализацию физиологических реакций сердечно-сосудистой системы, таких, как гипероксическая вазоконстрикция и гипероксический барорефлекс, которые ранее подробно не анализировались в литературе. Из широкого спектра нейротоксического действия кислорода в рамках настоящего обзора будут проанализированы пути и механизмы действия свободных радикалов на ГАМК-ергическую передачу в мозге, нарушение которой формирует судорожную реакцию ЦНС, известную как “кислородная эпилепсия”.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИПЕРБАРИЧЕСКОГО КИСЛОРОДА

Кислород в составе атмосферного воздуха является, пожалуй, самым важным элементом для поддержания жизни на Земле. Геологические исследования указывают, что в атмосфере нашей планеты концентрация кислорода существенно колебалась и ее величина стабилизировалась на уровне 21% примерно 500 миллионов лет назад. Кислород имеет высокий окислительно-восстановительный потенциал, поэтому является сильным окислителем, который “отрывает” электроны от биологических макромолекул, вызывая внутриклеточное повреждение. Если нет адекватной защиты от кислорода и способов восстановления вызванных им повреждений, возникают токсические эффекты. Токсичность кислорода обусловлена его промежуточными формами, известными как активные формы кислорода (ROS), которые обычно удаляются клеточными антиоксидантными системами. Есть основания полагать, что искусственное повышение парциального давления кислорода в дыхательной среде через ROS активизирует также эволюционно закрепленные адаптивные реакции сердечно-сосудистой системы, направленные на уменьшение доставки кислорода к органам и тканям при гипероксии. Такими физиологическими реакциями являются гипероксическая вазоконстрикция и гипероксический барорефлекс, которые направлены на ослабление или предотвращение токсического действия экстремальной гипероксии.

Гипероксическая вазоконстрикция. Как показано на рис. 1, первичными мишенями для гипербарического кислорода являются кровь и сосуды. Увеличение парциального давления кислорода в артериальной крови (PaO_2) полностью подавляет генерацию импульсов с хеморецепторов, что приводит к подавлению функции симпатического отдела автономной нервной системы. Данный факт часто используется в экспериментах для выключения кислородных хеморецепторов вместо их химической или хирургической денервации [1]. Повышение PaO_2 вызывает также сужение сосудов во всех органах у человека и животных [2–5]. Гипероксическая вазоконстрикция в меньшей степени выражена в коже, умеренно в кишечнике и отчетливо проявляется в сосудах скелетных мышц [6–8], легких [9], печени [10] и сетчатке глаза [11].

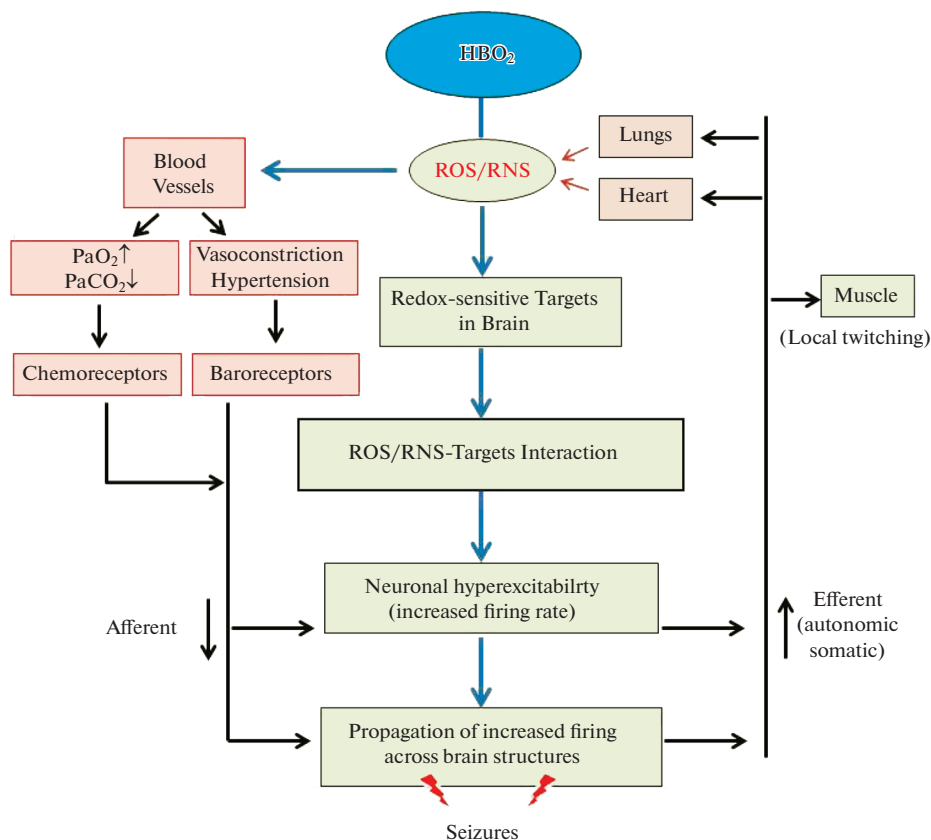


Рис. 1. Физиологическое и нейротоксическое действие гипербарического кислорода реализуются через генерацию реактивных форм кислорода и азота (ROS/RNS). Экспериментальные данные допускают существование в гипербарической гипероксии по меньшей мере двух путей действия ROS/RNS на клеточные компоненты различных органов и тканей. По одному из них реализуются срочные адаптивные реакции организма на гипероксию, которые запускаются через угнетение хеморецепторов (**chemoreceptors**) при повышении напряжения кислорода в артериальной крови (**PaO₂**) и активации барорецепторов (**baroreceptors**) в результате гипероксической вазоконстрикции (**vasoconstriction**) и острой гипертензии (**hypertension**). Аfferентные (**afferent**) сигналы от рецепторов интегрируются в ЦНС, где формируются эfferентные (**efferent**) влияния на легкие и сердце (**lungs, heart**), которые реализуют адаптивные реакции на гипероксию через симпатические и парасимпатические отделы автономной нервной системы. Другой путь нейротоксического действия ROS/RNS направлен на редокс-чувствительные мишени в головном мозге (**redox-sensitive targets in the brain**). Взаимодействие ROS/RNS с редокс-чувствительными мишенями приводит к усилению возбудимости нейронов мозга (**neuronal hyperexcitability**), проявляющейся в виде повышенной генерации спайковой активности. Локальные очаги высокой активности нейронов быстро распространяются по мозговым структурам, формируя генерализованную ЭЭГ-активацию, приводящую к судорогам. Подробные данные о генерации ROS/RNS и редокс-чувствительных мишенях в мозге представлены по ходу изложения обзора.

Наибольший вазоконстрикторный эффект гипероксии наблюдается в миокарде [12, 13] и головном мозге [3].

Вазоконстрикторные эффекты зависят от парциального давления кислорода в дыхательной среде и продолжительности гипероксической экспозиции. Порого-

вой величиной для вазоконстрикции является ~60% кислорода в нормобарической дыхательной среде [14]. При дальнейшем повышении парциального давления кислорода вазоконстрикция усиливается, но ее продолжительность сокращается. Так, при дыхании кислородом под давлением 3 АТА (абсолютных атмосфер) снижение мозгового кровотока в результате вазоконстрикции у крыс наблюдается около 3 ч, при 4 АТА продолжается до 90 мин, а при 5 АТА выявляется только в первые 30 мин гипероксической экспозиции [3].

Хотя о гипероксической вазоконстрикции известно уже более 100 лет [15], молекулярные механизмы реализации этой сосудистой реакции во многом непонятны [14, 16]. Предполагается, что вазоконстрикция реализуется за счет прямого действия кислорода на сосуды путем изменения проницаемости калиевых и кальциевых каналов в мембране гладкомышечных клеток. В частности, коронарная гипероксическая вазоконстрикция опосредуется закрытием АТФ-зависимых K^+ -каналов [12, 17]. Гипероксия может вызывать вазоконстрикцию также действуя непосредственно на кальциевые каналы L-типа, присутствующие в гладкомышечных клетках сосудов [18]. За все время существования этой гипотезы молекулярный механизм прямого действия кислорода на сократительный аппарат гладкомышечных клеток сосудов не доказан.

Согласно другой гипотезе, гипероксическая вазоконстрикция является результатом опосредованного действия кислорода на один или несколько эндотелиальных факторов, влияющих на сосудистый тонус, таких как эндотелин-1 [19–22] и вазоактивные простагландины [23]. Существование вазоактивных метаболитов в стенке сосудов экспериментально доказано, однако молекулярные механизмы их вазомоторного действия под влиянием $ГБО_2$ не установлены. После открытия оксида азота (NO) и механизма его действия на сосуды высказана идея о возможности его инактивации с помощью супероксиданионов [24–26]. Согласно этой гипотезе, вазоконстрикция является следствием инактивации эндотелиального NO супероксидными анионами с последующей утратой вазодилаторной компоненты базального сосудистого тонуса [27–29]. Как показали исследования на модели, гипероксия вызывает повышенную продукцию в эндотелиальных клетках и окружающей их среде супероксиданионов, которые кардинально меняют биодоступность оксида азота при реализации им вазомоторной функции [30]. Оксид азота продуцируется в сосудистом эндотелии путем окисления L-аргинина с участием фермента – эндотелиальной NO-синтазы (eNOS). Из-за большой площади эндотелиальной выстилки сосудов на ее долю приходится более 90% образуемого в организме оксида азота. Скорость синтеза NO в сосудистом эндотелии, измеренная *in situ* или в культуре, равна примерно 0.8 пмоль/мин/мг клеток, что в пересчете на 1.5 кг имеющихся в организме человека эндотелиальных клеток, составляет примерно 1728 мкмоль/сутки [31]. Данный расчет показывает, что в эндотелии образуется NO в тысячи раз больше, чем пороговая величина для реализации расслабления сосуда, равная 0.3 нМ [32]. Установлена гетерогенность eNOS по ходу сосудистого русла: в артериолах она наиболее высока, а в венах существенно меньше [33]. Наблюдаемая неоднородность распределения эндотелиальной NO-синтазы, возможно, объясняет сосудистую специфику констрикции при гипероксии. Так, сокращение сосудов наиболее выражено в артериолах диаметром 15–25 мкм, где относительная плотность eNOS и базальный уровень синтеза NO выше, чем в венах или более крупных артериях [34].

NO является мощным вазодилатором, липофильные молекулы которого свободно проникают из места синтеза в эндотелии в гладкомышечные клетки сосудов, где активируют фермент гуанилатциклазу, вызывая образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). В свою очередь, цГМФ активирует протеинкиназу G, которая, стимулируя кальциевую АТФ-азу сарко/эндоплазматического ретикулума

(SERCA), обеспечивает обратный захват цитозольного кальция в саркоплазматический ретикулум. Также цГМФ стимулирует выход кальция из клетки путем открытия активируемых кальцием калиевых каналов. Таким образом, внутриклеточная концентрация кальция снижается и киназа легких цепей миозина перестает фосфорилировать миозин. Результатом этого процесса является расслабление гладкомышечных клеток. Благодаря непрерывному синтезу, свободной диффузии и мощной вазоактивной потенции, NO формирует базальную релаксацию сосудов [25, 27].

Сосудистый тонус определяется множеством различных конкурирующих сосудосуживающих и сосудорасширяющих влияний, действующих на кровеносный сосуд. Эти влияния можно разделить на внешние факторы, возникающие вне органа или ткани, в которой расположен кровеносный сосуд, и внутренние факторы, возникающие в самом сосуде или окружающей ткани. Как правило, внешние (нейрогуморальные) факторы, такие как симпатические нервы и циркулирующий ангиотензин II, повышают тонус (т. е. вызывают сужение) сосудов; однако некоторые циркулирующие факторы (например, предсердный натрийуретический пептид) снижают сосудистый тонус. К внутренним факторам относятся миогенный механизм, эндотелиальные факторы (оксид азота, эндотелин). Они также могут снижать или повышать тонус сосуда. Местные гормоны/химические вещества в стенке сосудов (например, метаболиты арахидоновой кислоты, гистамин и брадикинин) могут повышать или понижать тонус. Метаболические побочные продукты или гипоксия обычно снижают тонус сосудов.

Гипероксия и, в особенности, ГБО₂ понижают уровень эндотелиального NO в головном мозге [35, 36]. Наиболее вероятным механизмом снижения эффективной концентрации NO является его инактивация, которая в норме осуществляется посредством химической реакции с молекулярным кислородом, супероксидным анионом, гемоглобином крови, веществами, содержащими металлы переменной валентности, и тканевыми тиолами. В условиях гипероксии концентрация гемоглобина и тканевых тиолов существенно не меняется. Напротив, тканевое рО₂ и концентрация супероксид-анионов возрастают пропорционально уровню гипероксигенации и их реакционные взаимодействия с NO становятся наиболее важными. При реакции NO с кислородом (автоокисление) образуются нитраты и, в меньшей степени, нитриты. В условиях нормального атмосферного давления и концентрации кислорода такая реакция протекает сравнительно медленно и ее определяет короткое время биологической жизни NO. Расчеты показывают, что концентрация NO в тканях могла бы быть около 10 мкМ, если бы существовал только один путь деградации NO через автоокисление [37]. В действительности концентрация NO в норме составляет около 10 нМ, а время биологической жизни при физиологической концентрации кислорода в тканях около 50 с [37]. Однако период полураспада NO существенно снижается, когда концентрация кислорода в тканях повышается, по меньшей мере, в 6 раз. Поэтому автоокисление как механизм снижения эффективной концентрации NO не может быть игнорирован при гипербарической гипероксии, так как рО₂ в ткани мозга при 3–4 АТА кислорода повышается в 15–20 раз [38]. Скорость реакции оксида азота с супероксиданионом почти в 1000 раз больше автоокисления NO [39]. Эта реакция протекает в 3.5 раза быстрее, чем процесс дисмутации супероксида, поэтому время биологической жизни NO в основном зависит от продукции свободного радикала кислорода.

Поскольку eNOS активна постоянно, непрерывная продукция NO формирует базальный дилататорный компонент сосудистого тонуса в противовес вазоконстрикторным миогенным и нейрогенным влияниям. При этом следует отметить также вклад оксида азота, продуцируемого в нервных клетках и нитроергических окончаниях, иннервирующих сосуды, в формирование сосудистого тонуса [30, 40].

Это подтверждается значительным ослаблением гипероксической вазоконстрикции у мышей-нокауты по eNOS [41] или подавлением синтеза NO путем фармакологического ингибирования эндотелиальной NO-синтазы [3]. Следует добавить также, что дилататорные свойства NO-доноров утрачиваются в условиях гипероксии [35], а гипероксическая вазоконстрикция блокируется у животных с предварительным введением миметика супероксиддисмутазы – ловушки супероксидных радикалов [42]. Повышение экстраклеточной супероксиддисмутазы (SOD3) в мозговой ткани понижает уровень супероксиданионов, сохраняя эндогенно продуцируемый NO на уровне, достаточном для поддержания тонуса и реактивности мозговых сосудов.

Хотя кислород требуется для синтеза NO и гипероксия стимулирует его продукцию в эндотелии, сужение кровеносных сосудов происходит из-за того, что усиленно генерируемые в их стенке супероксидные анион-радикалы связывают (инактивируют) NO, в результате чего снижается его биодоступность и утрачивается NO-опосредованный базальный вазорелаксирующий компонент сосудистого тонуса [43]. Потенциальными источниками продукции супероксида в сосудах служат НАД(Ф)Н-зависимые оксидазы, ксантиноксидаза, липоксигеназа, митохондриальные оксидазы и различные синтазы [44]. Следовательно, гипероксическая вазоконстрикция является следствием утраты NO-опосредованного вазодилаторного компонента базального сосудистого тонуса путем быстрого связывания свободного радикала NO интенсивно генерируемыми супероксид-анионами с образованием пероксинитрита, не обладающего выраженным вазомоторным действием [39].

При гипероксии ограниченное поступление NO к мышцам сосудов приводит к утрате сосудорасширяющей компоненты базального тонуса, в результате чего сохраняются только вазоконстрикторные влияния. Сосудосуживающая реакция значительно усиливается при гипербарической гипероксии в силу более интенсивной продукции супероксид-анионов и соответственно повышенной нейтрализации оксида азота. Следует подчеркнуть, что синтез NO при гипероксии также повышается, поэтому появление и выраженность гипероксической вазоконстрикции зависит от скорости продукции супероксид-анионов и оксида азота и, следовательно, баланса этих свободных радикалов. Нарушение баланса за счет повышенной продукции супероксид-анионов приводит к вазоконстрикции, а его сдвиг в сторону увеличения концентрации NO вызывает вазодилатацию [43].

В 1997 г. был открыт новый механизм вовлечения NO в гипероксическую вазоконстрикцию [45]. Этот механизм основан на способности эритроцитов регулировать доступность NO гладкомышечным клеткам сосудов в зависимости от градиента концентрации кислорода в крови. После синтеза в эндотелии NO диффундирует как к гладким мышцам сосудов, так и в поток крови, где взаимодействует с гемоглобином эритроцитов через высокоаффинные Fe^{2+} -связывающие участки гема, образуя нитрозилгемоглобин (FeNO-Hb). Реакции NO с гемоглобином происходят преимущественно в деоксигенированной крови, поэтому уровень FeNO-Hb всегда выше в венозной, чем в артериальной крови [46]. При оксигенации крови в легких часть связанного с гемом NO соединяется с остатками цистеина в бета-цепях гемоглобина (Cys β 93), образуя S-нитрозогемоглобин (SNO-Hb) [46, 47]. Некоторая часть SNO-Hb может образовываться также в результате реакций Hb с низкомолекулярным SNO и со свободным NO в насыщенной кислородом крови левого желудочка и крупных артерий.

Оксигенированная (R) и деоксигенированная (T) формы Hb находятся в динамическом равновесии. Обе формы всегда присутствуют в крови, но их количество изменяется в зависимости от концентрации кислорода и аллостерических факторов, влияющих на сродство Hb к кислороду (рН, углекислый газ и 2,3-бисфосфоглицерат). Синтез SNO-гемоглобина благоприятен в R-структуре (кровь с высо-

ким содержанием кислорода) [48]. SNO-Hb образуется при воздействии на гемоглобин NO, нитритов или низкомолекулярных (LMW) SNO в реакциях, которые часто включают в себя нитрозил железа (FeNO-Hb) [48–51]. NO, связанный с гемовым железом в бета-цепях гемоглобина, переходит на тиолы Cys β 93 при оксигенации (образование SNO-Hb обычно сопровождается продукцией небольшого количества metHb, который обеспечивает окислительно-восстановительное взаимодействие гемового железа (III) NO/CysNO). Эти вновь образованные SNO скрыты глубоко внутри оксигенированной молекулы гемоглобина [48]. Их отсоединение от гемовой группы требует переключения гемоглобина в T-состояние, после чего группы NO перемещаются от Cys β 93 к тиолам, находящимся в глутатионе и/или мембранном белке эритроцитов AE1 [52, 53]. S-нитрозилированный AE1 и SNO-глутатион могут усиливать выделение NO, вызывая вазодилатацию.

Образованная группа (SNO-окси Hb) в насыщенной кислородом артериальной крови используется для транспорта NO в микроциркуляторное русло. Прочность связывания NO в составе группы (SNO-окси Hb) зависит от насыщения гемоглобина кислородом. Низкий уровень pO_2 в крови на уровне артериол способствует высвобождению групп NO [48, 54] и, таким образом, прочность комплекса SNO-Hb обратно пропорциональна насыщению гемоглобина кислородом [53].

Реакции NO и его производных (нитрит и низкомолекулярный SNO), взаимодействующих с Hb, важно рассматривать в физиологическом контексте реализации NO-опосредованной гипероксической вазоконстрикции. Было показано, что при трансфузии донорской крови сосуды суживаются [55]. Позднее установили, что эта реакция является результатом захвата эндотелиального NO железом гема гемоглобина донорской крови, что снижает равновесную концентрацию NO в стенке сосуда ниже порога активации гуанилатциклазы и вызывает сокращения кровеносных сосудов [47, 56]. Данный факт послужил основанием для разработки новой технологии гемотрансфузии, основанной на насыщении донорской крови оксидом азота, что предотвращает вазоконстрикцию и усиливает уровень оксигенации скелетных мышц [57] и улучшает восстановление после субарахноидальной геморрагии [58].

Менее известен тот факт, что эритроциты также могут расширять кровеносные сосуды, тем самым увеличивая кровоток [47, 52, 59]. Вазодилатация в значительной степени осуществляется за счет S-нитрозотиолов (SNO), соединений NO, которые локализованы на остатках цистеина бета-цепей гемоглобина (Hb-Cys β 93-NO) или S-нитрозогемоглобина, (RSNO-Hb). Высвобождению NO из комплекса RSNO-Hb благоприятствует дезоксигенированная форма гемоглобина [48, 53]. Отсюда следует, что связывание и высвобождение групп NO из эритроцитов синхронизировано со связыванием и высвобождением ими кислорода. Сосуды сужаются, когда концентрация O_2 в тканях повышается, и расширяются, когда концентрация O_2 падает [48, 53, 60–62]. Регулируя биодоступность NO, тканевую перфузию можно согласовать с метаболической потребностью. Гипероксия и особенно ее гипербарическая форма повышает оксигенацию гемоглобина, что способствует большему захвату NO из эндотелия, но снижению выделения NO из эритроцитов [45]. Оба этих фактора снижают доступность NO гладкомышечным клеткам, что нарушает его баланс в сосудистой стенке и является важным элементом механизма вазоконстрикции.

Совокупность представленных данных свидетельствует, что NO-опосредованный механизм гипероксической вазоконстрикции основан на понижении биоактивности NO в стенке сосуда и периваскулярном пространстве. Такому снижению способствуют, по меньшей мере, три фактора: усиленная продукция супероксида-нионов, инактивирующих NO, повышенный захват NO железом гема гемоглобина [47, 56] и блокирование выделения группы NO из SNO-Hb при высоком pO_2 в ар-

териальной крови, что совместно снижает равновесную концентрацию NO в стенке сосуда ниже порога активации гуанилатциклазы и реализует гипероксическую вазоконстрикцию. Важное значение в регулировании биоактивности NO в стенке сосудов и периваскулярном пространстве имеют также уровень нитратов и нитритов в крови [63].

Гипероксический барорефлекс. Нейрогенная регуляция сердечно-сосудистой системы у человека и животных представлена наиболее известным механизмом – артериальным барорецепторным рефлексом. В нормальных условиях артериальное давление достаточно лабильно и быстро меняется в ответ на разнообразные внутренние и внешние стимулы, такие, как появление вазоактивных веществ в крови во время стресса, физическая нагрузка, ортостатические изменения кровообращения и другие. Во всех этих случаях нейрогенный барорефлекс через контролируемые вегетативной нервной системой хронотропные и инотропные реакции сердца и сосудов возвращает острые изменения давления к начальному или близкому к нему уровню. Нормобарическая или гипербарическая гипероксия никогда не рассматривалась в качестве причинного фактора, запускающего нейрогенный барорефлекторный механизм регуляции артериального давления. Между тем известно, что сердечно-сосудистая система человека и позвоночных животных отвечает на гипероксию вазоконстрикторной реакцией, изменениями артериального давления, замедлением сердечного ритма и уменьшением ударного выброса крови за счет понижения сократимости миокарда левого желудочка сердца. Все эти реакции сердечно-сосудистой системы на гипероксию известны давно, но, как правило, изучались раздельно вне связи друг с другом.

Так, гипероксическая вазоконстрикция у человека и животных [3, 4, 64, 65] реализуется с помощью различных механизмов, подробно изложенных выше. Если говорить коротко, в ее реализации принимают участие эндотелий-производные метаболиты: эндотелин, простагландины и продукты метаболизма арахидоновой кислоты с выраженными вазомоторными свойствами [19, 23]. В вазоконстрикцию при гипероксии вовлекается также NO, доступность которого гладкомышечным клеткам снижается за счет его инактивации усиленно генерируемыми при гипероксии супероксиданионами [27, 42, 66]. Другой NO-опосредованный механизм вазоконстрикции основан на блокировании выделения NO эритроцитами артериальной крови [45, 48].

Давно замечено, что артериальное давление при дыхании нормобарическим или гипербарическим кислородом повышается как у человека [4, 67], так и у позвоночных животных [68], однако механизм развития острой гипертензии остается мало понятным. Брадикардия является самой известной реакцией на гипероксию [69]. Она ослабевает у животных при блокаде мускариновых холинергических рецепторов или ваготомии [67, 70]. Спектральный анализ variability пульсового ритма показал, что кислород приводит к замедлению сердечных сокращений через повышение активности парасимпатической системы [70], однако причина возникновения брадикардической реакции остается неясной. Снижение сердечного выброса при гипероксии многократно демонстрировалось и связывалось с брадикардией, хотя понижение сократимости миокарда (уменьшение ударного объема) также не исключалось [71, 72].

Итак, если вазоконстрикцию представить как первичный ответ на гипероксию, приводящую к острой гипертензии, а брадикардию и снижение сердечного выброса – как ответные реакции, тогда все наблюдаемые сердечно-сосудистые реакции можно объединить в единый барорефлекторный механизм регуляции артериального давления при дыхании кислородом [73–75]. Высказанная гипотеза предполагает, что совокупность сердечно-сосудистых реакций, таких, как вазоконстрикция, острая гипертензия, брадикардия и снижение сердечного выброса является отра-

жением единой нейрорефлекторной реакции – гипероксического барорефлекса. Системная вазоконстрикция при гипероксии неизбежно приводит к резкому подъему артериального давления, что, в свою очередь, стимулирует аортальные и каротидные барорецепторы, импульсация от которых интегрируется в головном мозге, а затем по нисходящим эфферентным симпатическим и парасимпатическим волокнам вызывает брадикардию и снижение сердечного выброса (см. рис. 1).

Гипероксический барорефлекторный механизм запускается в первые секунды ингаляции кислородом, поэтому его можно оценить только с помощью непрерывной регистрации артериального давления и показателей сердечной деятельности [74]. Благодаря барорефлекторной реакции артериальное давление возвращается к исходному уровню при умеренной гипероксии, но в случае высокого ГБОУ гипертензия не компенсируется даже при наличии брадикардии и пониженного сердечного выброса. Барорефлекс в таких случаях “перенастраивается” на более высокий уровень артериального давления, как это наблюдается в случае хронической гипертонии [65]. Такой гипероксический барорефлекс реализуется с участием барорефлексогенных зон аорты и каротидных синусов, исходящих от барорецепторов афферентных нервных волокон и эфферентных симпатических и парасимпатических нервов, регулирующих сосудистый тонус, частоту и силу сердечных сокращений.

Гипероксия снижает симпатическую и повышает парасимпатическую активность вегетативной нервной системы. Триггером сдвига симпато-вагального баланса в гипероксии является повышенная активность барорецепторов и утрата импульсации с периферических хеморецепторов [72]. Установлено также, что усиление афферентной импульсации периферических барорецепторов вызывает в ЦНС стойкое торможение за счет повышения активности ГАМК-ергической системы, на что указывает увеличение уровня ГАМК в головном мозге [65, 73]. Следовательно, релаксирующее действие умеренной гипероксии сходно с эффектами медитации и йоги и, несомненно, дополняет лечебное действие гипербарической оксигенации.

По структурным компонентам гипероксический рефлекторный механизм не отличается от классического барорефлекса, контролирующего быстрые колебания артериального давления. Однако существует несколько особенностей в реализации нейрогенного рефлекса при гипероксии. Во-первых, если в нормальных физиологических условиях триггером барорефлекса является повышение внутрисосудистого давления, вызываемое, в основном, сосудосуживающими симпатическими влияниями [76], то в гипероксии вазоконстрикция реализуется за счет потери (ослабления) NO-опосредованного базального вазодилаторного компонента сосудистого тонуса и не связана с нервными вазомоторными механизмами. Гипероксия вызывает усиленную продукцию в стенке сосудов и периваскулярном пространстве супероксиданионов, которые связывают (инактивируют) эндотелиальный NO, в результате чего утрачивается вазорелаксирующий компонент сосудистого тонуса [27, 42, 66]. Убедительным подтверждением этому является отсутствие гипероксической вазоконстрикции у мышей-нокауты по эндотелиальной NOS [41].

Во-вторых, если в нормальных условиях исполнительным компонентом барорефлекса является уменьшение периферического сосудистого сопротивления из-за ослабления вазомоторного симпатического тонуса, то в гипероксии механизм снижения артериального давления базируется на вагус-опосредованной брадикардии и снижении сердечного выброса [73].

В-третьих, барорефлекторный механизм в гипероксии понижает возросшее артериальное давление, но полностью не возвращает его к исходному уровню. По всей вероятности, барорефлекс в гипероксии может адаптироваться или “перезапускаться”, как это происходит в условиях хронической гипертонии или после острого гипертонического криза [77]. Такая “перезагрузка” обеспечивает долго-

временный контроль артериального давления путем изменения афферентных, центральных или эфферентных компонентов артериального барорефлекса [76].

Эффективность или чувствительность барорефлекса, оцениваемая методом, предложенным Stauss [78], при повышенном давлении кислорода 1 и 3 АТА достоверно увеличивается по отношению к аналогичным показателям, полученным на тех же животных при дыхании атмосферным воздухом [74]. При 5 АТА наблюдается 2-фазное изменение чувствительности барорефлекса и соответствующих ему сердечно-сосудистых реакций. В первые 30–40 мин кислородной экспозиции эффективность барорефлекторной регуляции возрастает и отмечается умеренная брадикардия и снижение активности симпатической нервной системы. Продолжение гипербарической оксигенации приводит к развитию второй фазы, характеризующейся острым повышением артериального давления, переключением брадикардии на тахикардию и резким увеличением симпатической активности. В этот период отмечаются положительные хронотропный и инотропный эффекты деятельности сердца, а также значительное увеличение содержания в плазме крови адреналина и норадреналина [74]. Чувствительность барорефлекса сначала снижается, а затем полностью утрачивается на фоне появления кислородных судорог. Следовательно, устойчивость барорефлекса зависит от уровня и продолжительности гипероксического воздействия. При дыхании кислородом под давлением до 3 АТА чувствительность барорефлекса возрастает, что позволяет более эффективно реализовать адаптивные гемодинамические реакции, ограничивающие доставку токсической дозы кислорода в организм. Это выражается в прогрессирующей брадикардии и уменьшении сердечного выброса, связанных со снижением симпатических и увеличением парасимпатических влияний на сердце. Существенный вклад в краткосрочную адаптацию к гипероксии вносит также церебральная вазоконстрикция, благодаря которой уменьшается доставка кислорода в головной мозг и замедляется скорость генерации активных форм кислорода и азота ROS/RNS.

В норме барорецепторный рефлекс регулирует артериальное давление в пределах нормальных значений через петлю отрицательной обратной связи. Изменения артериального давления контролируются рецепторами растяжения, расположенными в каротидном синусе и дуге аорты. Одиночное ядро солитарного тракта, расположенное в сердечно-сосудистом центре продолговатого мозга, получает импульсы от этих рецепторов через афференты языкоглоточного и блуждающего нервов. Сердечно-сосудистый центр мозга состоит из двух функционально различных областей: область, ответственная за повышение артериального давления, расположена латерально и рострально, тогда как область, ответственная за снижение артериального давления, расположена в центре и каудально. Последняя область также интегрирует импульсы от гипоталамуса и лимбической систем, направленные на снижение симпатической активности, что приводит к уменьшению сократительной способности сердца, частоты сердечных сокращений и тонуса сосудов [79]. Кроме того, активация парасимпатической системы еще больше снижает частоту сердечных сокращений и сократительную способность миокарда.

Центральные механизмы реализации гипероксического барорефлекса систематически не изучались, но существуют отдельные данные о причастности центральной адренергической [80] и ГАМК-ергической систем мозга к барорефлекторной регуляции гемодинамики в гипероксии. Как показали опыты, активация ГАМК-ергической системы мозга путем блокады ГАМК-транспортеров в синапсах, усиливает эффективность барорефлекторной регуляции при гипероксии через симпатические и парасимпатические пути автономной нервной системы [81]. ГАМК-ергическая система не исчерпывает всех медиаторных систем мозга, вовлекающихся в реализацию гипероксического барорефлекса, и она не является специфической для реализации только гипероксического барорефлекса. Барорефлекс в гипероксии

отличается лишь модальностью стимула, повышающего артериальное давление. Все исполнительные механизмы рефлекса такие же, как и при других способах активации барорефлекторной регуляции артериального давления. Вместе с тем ГБО₂, который вызывает вазоконстрикцию, являющуюся триггером рефлекса, вносит определенные особенности в его реализацию. В частности, установлены фазные изменения эффективности гипероксического барорефлекса, зависящие от уровня и продолжительности гипероксического воздействия. При дыхании кислородом под давлением 3 АТА продолжительностью до 3 ч чувствительность барорефлекса сохраняется на более высоком уровне, чем до гипероксической экспозиции, что позволяет более эффективно реализовать адаптивные гемодинамические реакции, ограничивающие доставку токсической дозы кислорода в организм [74]. Эти реакции в виде прогрессирующей брадикардии и уменьшения ударного объема крови обеспечиваются понижением симпатических и увеличением парасимпатических влияний на сосуды и сердечную деятельность. Следовательно, нейрогенно-управляемое снижение сердечного выброса совместно с NO-опосредованной вазоконстрикцией ограничивают доставку кислорода в головной мозг, уменьшают скорость развития окислительного стресса в мозге и отодвигают нейротоксический эффект ГБО₂. Более высокий уровень гипероксии при 5 АТА подавляет гипероксический барорефлекс и существенно сокращает время развития кислородных судорог [74, 82]. Пока не совсем ясно, какие звенья рефлекторной дуги вовлечены в утрату рефлекса при развившихся кислородных судорогах, равно как неизвестны и молекулярные редокс-опосредованные механизмы, ответственные за потерю его чувствительности.

НЕЙРОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИПЕРБАРИЧЕСКОГО КИСЛОРОДА

Лимитирующим фактором широкого применения ГБО₂ является его токсическое действие на ЦНС, которое в клинике проявляется в виде эпилептиформной активности на электроэнцефалограмме и тонико-клонических нервно-мышечных судорог [83–86]. Ключевая роль в нейротоксическом действии ГБО₂ принадлежит активным формам кислорода (ROS) и азота (RNS), которые в силу своей высокой биологической активности способны поражать различные компоненты клеток мозга, нарушать функционирование нейрональных сетей и инициировать судороги [86, 87].

ROS представляют собой короткоживущие и высоко реакционноспособные молекулы. Генерация ROS в клетках мозга находится в равновесии с имеющейся в организме системой антиоксидантной защиты. Считается, что в низких и умеренных дозах ROS необходимы для регуляции физиологических функций и процессов, таких как клеточный цикл, пролиферация, дифференцировка, миграция и гибель клеток. ROS также играют важную роль в иммунной системе, поддержании окислительно-восстановительного баланса, участвуют в активации различных клеточных сигнальных путей. Избыточный уровень внутриклеточных ROS вызывает повреждение белков, нуклеиновых кислот, липидов, мембран и органелл, что может привести к активации процессов гибели клеток, таких как апоптоз и некроз [88, 89].

Существует две группы экспериментальных доказательств причастности ROS/RNS к развитию кислородных судорог. Во-первых, показано повышенное образование в мозге компонентов ROS – супероксид-анионов (O₂⁻), гидроксильных радикалов (OH⁻) и перекиси водорода (H₂O₂), причем скорость их продукции пропорциональна парциальному давлению вдыхаемого кислорода [85, 90–92]. ГБО₂ также стимулирует в мозге синтез оксида азота [36, 93], который является компонентом пула RNS, а происходящая с высокой скоростью химическая реак-

ция между O_2^- и NO приводит к образованию пероксинитрита ($ONOO^-$), мощного эндогенного оксиданта [39]. Накопление в мозге NO и 3-нитротирозина, маркера $ONOO^-$, показано у крыс после кислородной экспозиции [94] или непосредственно в кислородной барокамере [93]. Как показали опыты на нокаутных мышцах, основным источником NO-опосредованного образования $ONOO^-$ при гипероксии является нейрональная NO-синтаза (nNOS) [41, 95]. Скорость образования O_2^- и NO в мозге различна, поэтому нарушение их баланса является критическим фактором для развития судорожной активности в ГБО₂. Трансгенные мыши с повышенной экспрессией экстраклеточной супероксиддисмутазы (SOD3) показали более высокую восприимчивость к кислородным судорогам, чем обычные мыши, что демонстрирует ключевую роль баланса O_2^-/NO в нейротоксичности экстремальной гипероксии [96].

Вторая группа фактов свидетельствует о тесной связи между накоплением ROS/RNS и судорожной реакцией ЦНС в ГБО₂. Так, появлению пароксизмальной активности на ЭЭГ предшествует повышение продукции NO и $ONOO^-$, а также NO-опосредованного усиления мозгового кровотока [93]. Экспериментальные воздействия, лимитирующие продукцию или утилизацию ROS/RNS, предохраняют от развития кислородных судорог. Так, подавление биосинтеза NO путем системного ингибирования NOS с помощью L-NAME предотвращает появление кислородных судорог [97].

Как показано на рис. 1, участие ROS/RNS в иницировании судорог предполагает наличие в мозге редокс-чувствительных мишеней, воздействие на которые приводит к нарушению электрогенеза нейронов и синаптической передачи. Наиболее вероятная мишень для иницирования кислородных судорог найдена в ГАМК-ергической нейротрансмиссии. Установлено, что ГБО₂ ингибирует синтез ГАМК в мозге, что приводит к ослаблению тормозной нейротрансмиссии с последующим сдвигом баланса процессов возбуждения и торможения в ЦНС [85, 98]. Доказательством этому является снижение ГАМК в межклеточной среде мозга крыс, зарегистрированное *in vivo* во время ГБО₂-экспозиции с помощью микродиализа, сопряженного с высокоэффективной жидкостной хроматографией [98]. Установлено, что причиной уменьшения внеклеточной ГАМК в ГБО₂ является понижение активности глутаматдекарбоксилазы (GAD), катализирующей синтез тормозного медиатора в нервных клетках [99]. Если ROS/RNS угнетают синтез ГАМК в ГБО₂ путем инактивации GAD, возникает вопрос о молекулярном механизме повреждения. Короткий латентный период появления кислородных судорог при высоких значениях ГБО₂ позволяет исключить из рассмотрения синтез биомолекул *de novo* через генную экспрессию и оставить только две возможные реакции взаимодействия: окисление липидов и посттрансляционную модификацию белков. Атака ROS на жирные кислоты мембраны нервных клеток может заканчиваться полимеризацией последних, приводящей к нарушению ионных механизмов генерации вызванных потенциалов нейронов. Белки, представленные в ферментах, рецепторах, ионных каналах и транспортерах нейромедиаторов, содержат в своем составе аминокислоты, концевые остатки которых легко поддаются окислению или нитрозилированию при действии ROS/RNS. Особое внимание привлекает реакция белков, содержащих цистеин, с оксидом азота (S-nitrosylation). Показано, что угнетение ферментативной активности GAD в ГБО₂ происходит за счет ее S-нитрозилирования – присоединения группы оксида азота к тиоловым остаткам цистеина внутри белка-фермента [99]. Снижение ферментативной активности в ГБО₂ при 5 АТА наблюдается также у глутаминсинтетазы, катализирующей катаболизм глутамата [100]. Однако ГАМК-трансаминаза, участвующая в деградации тормозного нейромедиатора, и ГАМК-

транспортёры, обеспечивающие удаление тормозного нейромедиатора из синаптической щели, не теряют своей активности в гипербарической кислородной среде [81, 99]. К указанным ферментам – мишеням для ROS/RNS следует добавить также мембранную Na/K-АТФазу, обеспечивающую активный трансмембранный транспорт ионов в нервных клетках при генерации электрических потенциалов.

Кислородные судороги, возникающие из-за угнетения синтеза ГАМК, могут быть предотвращены путем увеличения уровня медиатора в синаптическом пространстве с помощью фармакологических препаратов, таких как вигабатрин [101]. Недавние исследования показали, что ингибиторы ГАМК-трансаминазы и ГАМК-транспортёров, вигабатрин и тиагабин соответственно, повышают концентрацию ГАМК-медиатора в головном мозге и предотвращают развитие кислородных судорог [81, 102]. Следовательно, при подавлении синтеза ГАМК в ГБО₂ замедление клиренса медиатора из синапсов или ослабление его разрушения могут повысить концентрацию тормозного медиатора до уровня, достаточного для реализации полноценной ГАМК-ергической функции и, тем самым, предотвратить развитие судорожного синдрома. Поэтому вполне оправдано использование противосудорожных препаратов для предотвращения развития гипербарических кислородных судорог при экстремальной гипероксии [103].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При нормальных условиях в здоровом организме продукция и клиренс ROS хорошо сбалансированы. Дыхание гипербарическим кислородом смещает этот баланс в сторону увеличения количества ROS, которое выходит за пределы возможности системы антиоксидантной защиты и способствует развитию окислительного стресса. Однако не всякий оксидативный стресс вреден для функционирования физиологических систем. Увеличение активности молекулярных процессов может возникать при усилении окислительного стресса, хотя невозможно точно охарактеризовать его параметры. Примером сказанному может служить усиление биогенеза митохондрий в головном мозге крыс после их экспозиции в экстремальной гипероксической среде [104, 105]. Другим примером является усиление регуляции функций ионных каналов при повышенной продукции ROS [106]. Выявлено существенное подавление нейронального апоптоза после сеансов гипербарической оксигенации [107, 108]. Известно также, что во время физических упражнений, индуцирующих выработку ROS, происходит активация специфических антиоксидантных ферментов, таких как SOD, и усиление их влияния на функцию печени [109], наблюдается также и улучшение функций верхних конечностей после экспозиции в ГБО₂ [110]. В последние годы неоднократно продемонстрировано существенное улучшение состояния пациентов с ишемическими поражениями мозга после нескольких сеансов гипербарической оксигенации [111–113].

Идея о том, что воздействие небольшой дозы опасного вещества или фактора может вызвать благоприятную биологическую реакцию давно известна, получила название “*гормезис*” и является характеристикой многих биологических процессов, а именно двухфазной реакцией на воздействие возрастающих концентраций вещества или фактора среды [114]. В пределах *гормезисной* зоны биологическая реакция на низкое воздействие стрессора, как правило, благоприятна, а в большей дозе наблюдается токсический эффект.

ГБО₂ относится к терапевтическим веществам и, как многие лекарственные препараты, может оказывать физиологическое и токсическое действие. Биологические эффекты зависят от скорости продукции и продолжительности влияния ROS/RNS, определяемых величиной парциального давления вдыхаемого кислорода [115]. Основным терапевтическим эффектом ГБО₂ является устранение дефици-

та кислородного снабжения тканей для обеспечения полноценного уровня окислительного метаболизма. Дополнительно к этому, умеренная гипероксия вызывает физиологические реакции, усиливающие терапевтическое действие кислорода. Кроме того, ROS и RNS участвуют в каскадах и путях активации различных факторов роста, мобилизации стволовых клеток [116], удлинении теломер хромосом [117] и других молекулярных процессах, определяющих лечебный эффект ГБО₂. Высокий уровень продукции ROS/RNS токсичен для клеток, особенно для нейронов мозга. Клеточные мишени для действия ROS/RNS локализируются в местах продукции этих редокс-молекул, а биохимическое взаимодействие приводит к посттрансляционным изменениям структуры белков, приводящих к нарушению или полной утрате их функции. Нарушения нейротрансмиссии, приводящие к развитию кислородных судорог, становятся понятнее при использовании фармакологических средств с известным механизмом действия. К ним относятся противоэпилептические препараты, допущенные и широко используемые в лечении заболеваний, в патогенезе которых присутствует повышенная судорожная готовность. Их тестирование на животных подтвердило высокую эффективность для предотвращения гипербарических кислородных судорог [118], что открывает перспективу трансляции результатов в практику использования ГБО₂ в медицине и при подводных погружениях.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-25-00539).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и концептуальный анализ работы (И.Т.Д.), критический анализ собственного опыта по теме обзора (С.Ю.Ж., Т.Ф.П., О.С.А.), сбор и анализ литературных данных (С.Ю.Ж., Т.Ф.П.), обработка данных (О.С.А., С.Ю.Ж., Т.Ф.П.), написание и редактирование рукописи (И.Т.Д., О.С.А.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fitzgerald RS, Rocher A* (2021) Physiology and Pathophysiology of Oxygen Sensitivity. *Antioxidants* 10: 1114. <https://doi.org/10.3390/antiox10071114>
2. *Brown MM, Wade JP, Marshall J* (1985) Fundamental importance of arterial oxygen content in the regulation of cerebral blood flow in man. *Brain* 108 (Pt1): 81–93. <https://doi.org/10.1093/brain/108.1.81>
3. *Demchenko IT, Boso AE, O'Neill TJ, Bennett PB, Piantadosi CA* (2000) Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* (1985) 88(4): 1381–1389. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.1381>
4. *Molénat F, Boussuges A, Grandfond A, Rostain JC, Sainy JM, Robinet C, Galland F, Meliet JL* (2004) Haemodynamic effects of hyperbaric hyperoxia in healthy volunteers: an echocardiographic and Doppler study. *Clin Sci (Lond)* 106(4): 389–395. <https://doi.org/10.1042/CS20030293>
5. *Smit B, Smulders YM, van der Wouden JC, Oudemans-van Straaten HM, Spoelstra-de Man AME* (2018) Hemodynamic effects of acute hyperoxia: systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 22(1): 45. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-1968-2>

6. Pries AR, Heide J, Ley K, Klotz KF, Gaehtgens P (1995) Effect of oxygen tension on regulation of arteriolar diameter in skeletal muscle in situ. *Microvasc Res* 49(3): 289–299. <https://doi.org/10.1006/mvres.1995.1025>
7. Smith KM, Moore LC, Layton HE (2003) Advective transport of nitric oxide in a mathematical model of the afferent arteriole. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(5): F1080–F1096. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00141.2002>
8. Milstein DM, Helmers R, Hackmann S, Belterman CN, van Hulst RA, de Lange J (2016) Sublingual microvascular perfusion is altered during normobaric and hyperbaric hyperoxia. *Microvasc Res* 105: 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.02.001>
9. Ariyaratnam P, Loubani M, Bennett R, Griffin S, Chaudhry MA, Cowen ME, Guvendik L, Cale AR, Morice AH (2013) Hyperoxic vasoconstriction of human pulmonary arteries: a novel insight into acute ventricular septal defects. *ISRN Cardiol* 2013: 685735. <https://doi.org/10.1155/2013/685735>
10. Eshmunov D, Becker D, Hefli ML, Mueller M, Hagedorn C, Dutkowski P, Rudolf von Rohr P, Halbe M, Seeger S, Tibbitt MW, Bautista Borrego L, Schuler MJ, Clavien PA (2020) Hyperoxia in portal vein causes enhanced vasoconstriction in arterial vascular bed. *Sci Rep* 10(1): 20966. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77915-0>
11. Mishra A, Hamid A, Newman EA (2011) Oxygen modulation of neurovascular coupling in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(43): 17827–17831. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110533108>
12. Mouren S, Souktani R, Beauquier M, Abdenour L, Arthaud M, Duvelleroy M, Vicaut E (1997) Mechanisms of coronary vasoconstriction induced by high arterial oxygen tension. *Am J Physiol* 272(1Pt2): H67–H75. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.1.H67>
13. Farquhar H, Weatherall M, Wijesinghe M, Perrin K, Ranchord A, Simmonds M, Beasley R (2009) Systematic review of studies of the effect of hyperoxia on coronary blood flow. *Am Heart J* 158(3): 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2009.05.037>
14. Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA (2005) Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(2): L159–L173. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00060.2005>
15. Benedict FG, Higgins HL (1911) Effects on men at rest of breathing oxygen-rich gas mixtures. *Am J Physiol* 28: 1–28.
16. Jackson WF (2016) Arteriolar oxygen reactivity: where is the sensor and what is the mechanism of action? *J Physiol* 594(18): 5055–5077. <https://doi.org/10.1113/JP270192>
17. Ngo AT, Riemann M, Holstein-Rathlou NH, Torp-Pedersen C, Jensen LJ (2013) Significance of K(ATP) channels, L-type Ca²⁺ channels and CYP450-4A enzymes in oxygen sensing in mouse cremaster muscle arterioles in vivo. *BMC Physiol* 13: 1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-13-8>
18. Welsh DG, Jackson WF, Segal SS (1998) Oxygen induces electromechanical coupling in arteriolar smooth muscle cells: a role for L-type Ca²⁺ channels. *Am J Physiol* 274(6): H2018–H2024. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.6.H2018>
19. Dallinger S, Dorner GT, Wenzel R, Graselli U, Findl O, Eichler HG, Wolzt M, Schmetterer L (2000) Endothelin-1 contributes to hyperoxia-induced vasoconstriction in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(3): 864–869.
20. Bourque SL, Davidge ST, Adams MA (2011) The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(6): R1288–R1295. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00397.2010>
21. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD (2011) Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J* 25(1): 16–28. <https://doi.org/10.1096/fj.10-161612>
22. Nishiyama SK, Zhao J, Wray DW, Richardson RS (2017) Vascular function and endothelin-1: tipping the balance between vasodilation and vasoconstriction. *J Appl Physiol* (1985) 122(2): 354–360. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00772.2016>
23. Rousseau A, Tesselaar E, Henricson J, Sjöberg F (2010) Prostaglandins and radical oxygen species are involved in microvascular effects of hyperoxia. *J Vasc Res* 47(5): 441–450. <https://doi.org/10.1159/000282667>
24. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- 84(24): 9265–9269.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>
25. *Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA* (1994) Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 14(2): 175–192.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.25>
 26. *Czapski G, Goldstein S* (1995) The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach. *Free Radic Biol Med* 19(6): 785–794.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00081-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00081-8)
 27. *Rubanyi GM, Vanhoutte PM* (1986) Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250(5Pt2): H822–H827.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1986.250.5.H822>
 28. *Katusic ZS* (1996) Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic Biol Med* 20(3): 443–448.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)02116-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)02116-8)
 29. *Zhilyaev SYu, Moskvina AN, Platonova TF, Gutsaeva DR, Churilina IV, Demchenko IT* (2003) Hyperoxic vasoconstriction in the brain is mediated by inactivation of nitric oxide by superoxide anions. *Neurosci Behav Physiol* 33(8): 783–787.
<https://doi.org/10.1023/a:1025145331149>
 30. *Haselden WD, Kedarasetti RT, Drew PJ* (2020) Spatial and temporal patterns of nitric oxide diffusion and degradation drive emergent cerebrovascular dynamics. *PLoS Comput Biol* 16(7): e1008069. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008069>
 31. *Kelm M* (1999) Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1411(2–3): 273–289.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(99\)00020-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(99)00020-1)
 32. *Yan O, Liu Q, Zweier JL, Liu X* (2007) Potency of authentic nitric oxide in inducing aortic relaxation. *Pharmacol Res* 55(4): 329–334.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.001>
 33. *Heaps CI, Bray JF, McIntosh AI, Schroeder F* (2019) Endothelial nitric oxide synthase protein distribution and nitric oxide production in endothelial cells along the coronary vascular tree. *Microvasc Res* 122: 34–40.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.11.004>
 34. *Andries LJ, Brutsaert DL, Sys SU* (1998) Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. *Circ Res* 82(2): 195–203.
<https://doi.org/10.1161/01.res.82.2.195>
 35. *Demchenko IT, Boso AE, Bennett PB, Whorton AR, Piantadosi CA* (2000) Hyperbaric oxygen reduces cerebral blood flow by inactivating nitric oxide. *Nitric Oxide* 4(6): 597–608.
<https://doi.org/10.1006/niox.2000.0313>
 36. *Thom SR, Bhopale V, Fisher D, Manevich Y, Huang PL, Buerk DG* (2002) Stimulation of nitric oxide synthase in cerebral cortex due to elevated partial pressures of oxygen: an oxidative stress response. *J Neurobiol* 51(2): 85–100.
<https://doi.org/10.1002/neu.10044>
 37. *Lancaster JR Jr* (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8137–8141.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.8137>
 38. *Demchenko IT, Luchakov YI, Moskvina AN, Gutsaeva DR, Allen BW, Thalmann ED, Piantadosi CA* (2005) Cerebral blood flow and brain oxygenation in rats breathing oxygen under pressure. *J Cereb Blood Flow Metab* 25(10): 1288–1300.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600110>
 39. *Beckman JS, Koppenol WH* (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271(5Pt1): C1424–C1437.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424>
 40. *Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW* (2015) Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci* 129(2): 83–94.
<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>
 41. *Atochin DN, Demchenko IT, Astern J, Boso AE, Piantadosi CA, Huang PL* (2003) Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(10): 1219–1226.
<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000089601.87125.E4>
 42. *Demchenko IT, Oury TD, Crapo JD, Piantadosi CA* (2002) Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circ Res* 91(11): 1031–1037.
<https://doi.org/10.1161/01.res.0000043500.03647.81>
 43. *Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S* (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320(6061): 454–456.
<https://doi.org/10.1038/320454a0>

44. Channon KM, Guzik TJ (2002) Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol* 53(4Pt1): 515–524.
45. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA (1997) Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276(5321): 2034–2037.
<https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2034>
46. McMahon TJ, Moon RE, Luschinger BP, Carraway MS, Stone AE, Stolp BW, Gow AJ, Pawloski JR, Watke P, Singel DJ, Piantadosi CA, Stamler JS (2002) Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med* 8(7): 711–717.
<https://doi.org/10.1038/nm718>
47. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS (1996) S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380(6571): 221–226.
<https://doi.org/10.1038/380221a0>
48. Singel DJ, Stamler JS (2005) Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. *Annu Rev Physiol* 67: 99–145.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.060603.090918>
49. Luschinger BP, Rich EN, Gow AJ, Williams EM, Stamler JS, Singel DJ (2003) Routes to S-nitroso-hemoglobin formation with heme redox and preferential reactivity in the beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(2): 461–466.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0233287100>
50. Angelo M, Singel DJ, Stamler JS (2006) An S-nitrosothiol (SNO) synthase function of hemoglobin that utilizes nitrite as a substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(22): 8366–8371.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0600942103>
51. Nagababu E, Ramasamy S, Rifkind JM (2006) S-nitrosohemoglobin: a mechanism for its formation in conjunction with nitrite reduction by deoxyhemoglobin. *Nitric Oxide* 15(1): 20–29.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.01.012>
52. Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS (2001) Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 409(6820): 622–626.
<https://doi.org/10.1038/35054560>
53. Doctor A, Platt R, Sheram ML, Eischeid A, McMahon T, Maxey T, Doherty J, Axelrod M, Kline J, Gurka M, Gow A, Gaston B (2005) Hemoglobin conformation couples erythrocyte S-nitrosothiol content to O₂ gradients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(16): 5709–5714.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407490102>
54. Pezacki JP, Ship NJ, Kluger R (2001) Release of nitric oxide from S-nitrosohemoglobin. Electron transfer as a response to deoxygenation. *J Am Chem Soc* 123(19): 4615–4616.
<https://doi.org/10.1021/ja015716o>
55. Keipert PE, Gonzales A, Gomez CL, MacDonald VW, Hess JR, Winslow RM (1993) Acute changes in systemic blood pressure and urine output of conscious rats following exchange transfusion with diaspirin-crosslinked hemoglobin solution. *Transfusion* 33(9): 701–708.
<https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1993.33994025016.x>
56. Tsai AG, Cabrales P, Manjula BN, Acharya SA, Winslow RM, Intaglietta M (2006) Dissociation of local nitric oxide concentration and vasoconstriction in the presence of cell-free hemoglobin oxygen carriers. *Blood* 108(10): 3603–3610.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-005272>
57. Reynolds JD, Bennett KM, Cina AJ, Diesen DL, Henderson MB, Matto F, Plante A, Williamson RA, Zandinejad K, Demchenko IT, Hess DT, Piantadosi CA, Stamler JS (2013) S-nitrosylation therapy to improve oxygen delivery of banked blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(28): 11529–11534.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1306489110>
58. Sheng H, Reynolds JD, Auten RL, Demchenko IT, Piantadosi CA, Stamler JS, Warner DS (2011) Pharmacologically augmented S-nitrosylated hemoglobin improves recovery from murine subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 42(2): 471–476.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.600569>
59. Helms CC, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB (2018) Erythrocytes and Vascular Function: Oxygen and Nitric Oxide. *Front Physiol* 9: 125–128.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00125>
60. Roach RC, Koskolou MD, Calbet JA, Saltin B (1999) Arterial O₂ content and tension in regulation of cardiac output and leg blood flow during exercise in humans. *Am J Physiol* 276(2): H438–H445.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.2.H438>
61. Gonzalez-Alonso J, Richardson RS, Saltin B (2001) Exercising skeletal muscle blood flow in humans responds to reduction in arterial oxyhaemoglobin, but not to altered free oxygen. *J Physiol* 530(Pt2): 331–341.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.03311.x>

62. *González-Alonso J, Mortensen SP, Dawson EA, Secher NH, Damsgaard R* (2006) Erythrocytes and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of erythrocyte count and oxygenation state of haemoglobin. *J Physiol* 572(Pt1): 295–305. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.101121>
63. *DeMartino AW, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Gladwin MT* (2019) Nitrite and nitrate: chemical biology and signalling. *Br J Pharmacol* 176: 228–245. <https://doi.org/10.1111/bph.14484>
64. *Floyd TF, Clark JM, Gelfand R, Detre JA, Ratcliffe S, Guvakov D, Lambertsen CJ, Ekenhoff RG* (2003) Independent cerebral vasoconstrictive effects of hyperoxia and accompanying arterial hypocapnia at 1 ATA. *J Appl Physiol* (1985) 95(6): 2453–2461. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00303.2003>
65. *Bulte DP, Chiarelli PA, Wise RG, Jezard P* (2007) Cerebral perfusion response to hyperoxia. *J Cereb Blood Flow Metab* 27(1): 69–75. <https://doi.org/10.1038/sj.cjcbfm.9600319>
66. *Pasgaard T, Stankevicius E, Jørgensen MM, Ostergaard L, Simonsen U, Frøbert O* (2007) Hyperoxia reduces basal release of nitric oxide and contracts porcine coronary arteries. *Acta Physiol (Oxf)* 191(4): 285–296. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01745.x>
67. *Shibata S, Iwasaki K, Ogawa Y, Kato J, Ogawa S* (2005) Cardiovascular neuroregulation during acute exposure to 40, 70, and 100% oxygen at sea level. *Aviat Space Environ Med* 76(12): 1105–1110.
68. *Gole Y, Gargne O, Coulange M, Steinberg JG, Bouhaddi M, Jammes Y, Regnard J, Boussuges A* (2011) Hyperoxia-induced alterations in cardiovascular function and autonomic control during return to normoxic breathing. *Eur J Appl Physiol* 111(6): 937–946. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1711-4>
69. *Schipke JD, Muth T, Pepper C, Schnependahl J, Hoffmanns M, Dreyer S* (2022) Hyperoxia and the cardiovascular system: experiences with hyperbaric oxygen therapy. *Med Gas Res* 12(4): 153–157. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.337997>
70. *Larsson A, Uusijärvi J, Eksborg S, Lindholm P* (2010) Tissue oxygenation measured with near-infrared spectroscopy during normobaric and hyperbaric oxygen breathing in healthy subjects. *Eur J Appl Physiol* 109(4): 757–761. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1403-0>
71. *Neubauer B, Tetzlaff K, Staschen CM, Bettinghausen E* (2001) Cardiac output changes during hyperbaric hyperoxia. *Int Arch Occup Environ Health* 74(2): 119–122. <https://doi.org/10.1007/s004200000201>
72. *Savitt MA, Rankin JS, Elberry JR, Owen CH, Camporesi EM* (1994) Influence of hyperbaric oxygen on left ventricular contractility, total coronary blood flow, and myocardial oxygen consumption in the conscious dog. *Undersea Hyperb Med* 21(2): 169–183.
73. *Demchenko IT, Zhilyaev SY, Moskvina AN, Piantadosi CA, Allen BW* (2011) Autonomic activation links CNS oxygen toxicity to acute cardiogenic pulmonary injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300(1): L102–L111. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00178.2010>
74. *Demchenko IT, Gasier HG, Zhilyaev SY, Moskvina AN, Krivchenko AI, Piantadosi CA, Allen BW* (2014) Baroreceptor afferents modulate brain excitation and influence susceptibility to toxic effects of hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* (1985) 117(5): 525–534. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00435.2014>
75. *Zhilyaev SY, Platonova TF, Alekseeva OS, Nikitina ER, Demchenko IT* (2019) Adaptive mechanisms of baroreflexory regulation of the cardiovascular system in extreme hyperoxia. *J Evol Biochem Physiol* 55(5): 365–371. <https://doi.org/10.1134/S002209301905003X>
76. *Guyenet PG* (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7(5): 335–346. <https://doi.org/10.1038/nrn1902>
77. *Thrasher TN* (2005) Baroreceptors, baroreceptor unloading, and the long-term control of blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(4): R819–R827. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00813.2004>
78. *Stauss HM, Moffitt JA, Chappleau MW, Abboud FM, Johnson AK* (2006) Baroreceptor reflex sensitivity estimated by the sequence technique is reliable in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1): H482–H483. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00228.2006>
79. *Henderson LA, Richard CA, Macey PM, Runquist ML, Yu PL, Galons JP, Harper RM* (2004) Functional magnetic resonance signal changes in neural structures to baroreceptor reflex activation. *J Appl Physiol* (1985) 96(2): 693–703. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00852.2003>
80. *Platonova TF, Alekseeva OS, Nikitina ER, Demchenko IT* (2020) Blockade of Brain Adrenoreceptors Delays Seizure Development during Hyperbaric Oxygen Breathing. *J Evol Biochem*

- Phys 56(5): 425–433.
<https://doi.org/10.1134/S0022093020050051>
81. Demchenko IT, Zhilyaev SYu, Platonova TF, Alekseeva OS, Nikitina ER (2021) Inhibition of GABA transaminase and GABA transporters in the brain by vigabatrin and tiagabine prevents seizure development in rats breathing hyperbaric oxygen. *J Evol Biochem Physiol* 57(5): 1101–1109.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021050112>
 82. Жильяев СЮ, Москвин АН, Платонова ТФ, Демченко ИТ (2015) Электрическая стимуляция вагусного нерва модулирует развитие кислородной эпилепсии у кроликов. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 101(11): 1279–1288. [Zhilyaev SYu, Moskvina AN, Platonova TF, Demchenko IT (2015) Electric stimulation of vagus nerve modulates a propagation of oxygen epilepsy in rabbits. *Russ J Physiol* 101(11): 1279–1288. (In Russ)].
 83. Зальцман ГЛ (1968) Стадии развития кислородной эпилепсии и функциональное состояние нервной системы. В кн. Гипербарические эпилепсия и наркоз. Л. Наука. [Zaltsman GL (1968) Stages of formation of oxygen epilepsy and the functional state of the centres of the nervous system. In book: Hyperbaric epilepsy and narcosis. Ed Zaltsman GL Leningrad. Nauka. (In Russ)].
 84. Селивра АИ (1983) Гипербарическая оксигенация. Физиологические механизмы реакций центральной нервной системы на гипероксию. Л. Наука. [Selivra AI (1983) Hyperbaric oxygenation. Physiological mechanisms of central nervous system responses to hyperoxia. Leningrad. Nauka. (In Russ)].
 85. Dean JB, Mulkey DK, Garcia AJ 3rd, Putnam RW, Henderson RA 3rd (2003) Neuronal sensitivity to hyperoxia, hypercapnia, and inert gases at hyperbaric pressures. *J Appl Physiol* (1985) 95(3): 883–909.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00920.2002>
 86. Ciarlone GE, Hinojo CM, Stavitzski NM, Dean JB (2019) CNS function and dysfunction during exposure to hyperbaric oxygen in operational and clinical settings. *Redox Biol* 27: 101–159.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101159>
 87. Poff AM, Kernagis D, D'Agostino DP (2017) Hyperbaric Environment: Oxygen and Cellular Damage versus Protection. *Compr Physiol* 7: 213–234.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c150032>
 88. Zhang Y, Wang Z, Chen Y, Li R (2019) Intermittent hyperbaric oxygen exposure mobilizing peroxiredoxin 6 to prevent oxygen toxicity. *J Physiol Sci* 69: 779–790.
<https://doi.org/10.1007/s12576-019-00694-5>
 89. Zhang Y, You B, Chen Y, Yang J, Xie C, Huang G, Li R, Hu P (2020) Effect of Transcriptional Regulatory Factor FoxO3a on Central Nervous System Oxygen Toxicity. *Front Physiol* 11: 596326.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.596326>
 90. Torbati D, Church DF, Keller JM, Pryor WA (1992) Free radical generation in the brain precedes hyperbaric oxygen-induced convulsions. *Free Radic Biol Med* 13(2): 101–106.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90070-w](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90070-w)
 91. D'Agostino DP, Putnam RW, Dean JB (2007) Superoxide (O_2^-) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. *J Neurophysiol* 98(2): 1030–1041.
 92. Ciarlone GE, Dean JB (2016) Normobaric hyperoxia stimulates superoxide and nitric oxide production in the caudal solitary complex of rat brain slices. *Am J Physiol Cell Physiol* 311(6): C1014–C1026.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00160.2016>
 93. Demchenko IT, Boso AE, Whorton AR, Piantadosi CA (2001) Nitric oxide production is enhanced in rat brain before oxygen-induced convulsions. *Brain Res* 917(2): 253–261.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03057-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03057-8)
 94. Chavko M, Auker CR, McCarron RM (2003) Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures. *Nitric Oxide* 9(1): 18–23.
[https://doi.org/10.1016/S1089-8603\(03\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1089-8603(03)00045-4)
 95. Allen BW, Demchenko IT, Piantadosi CA (2009) Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanisms of oxygen toxicity. *J Appl Physiol* (1985) 106(2): 662–667.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91109.2008>
 96. Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD (1992) Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O_2 toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9715–9719.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9715>
 97. Bitterman N, Bitterman H (1998) L-arginine-NO pathway and CNS oxygen toxicity. *J Appl Physiol* (1985) 84(5): 1633–1638.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.5.1633>
 98. Demchenko IT, Piantadosi CA (2006) Nitric oxide amplifies the excitatory to inhibitory neurotransmitter imbalance accelerating oxygen seizures. *Undersea Hyperb Med* 33(3): 169–174.

99. *Gasier HG, Demchenko IT, Tatro LG, Piantadosi CA* (2017) S-nitrosylation of GAD65 is implicated in decreased GAD activity and oxygen-induced seizures. *Neurosci Lett* 653: 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.067>
100. *Alekseeva OS, Zhilyaev SYu, Platonova TF, Tsyba DL, Kirik OV, Korzhhevskii DE, Demchenko IT* (2022) Involvement of glutamine synthetase in the development of hyperbaric oxygen seizures. *J Evol Biochem Physiol* 58(1): 158–166. <https://doi.org/10.1134/S0022093022010148>
101. *Hall AA, Young C, Bodo M, Mahon RT* (2013) Vigabatrin prevents seizure in swine subjected to hyperbaric hyperoxia. *J Appl Physiol* (1985) 115(6): 861–867. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00221.2013>
102. *Moskvin AN, Platonova TPh, Zhilyaev SYu, Alekseeva OS, Nikitina ER, Demchenko IT* (2020) Blockade of γ -Aminobutyric Acid Transporters in Brain Synapses Protects Against Hyperbaric Oxygen-Induced Convulsions. *Neurosci Behav Physiol* 50(4): 505–510. <https://doi.org/10.1007/s11055-020-00930-1>
103. *Demchenko IT, Zhilyaev SYu, Moskvin AN, Krivchenko AI, Piantadosi CA, Allen BW* (2017) Antiepileptic drugs prevent seizures in hyperbaric oxygen: A novel model of epileptiform activity. *Brain Res* 1657: 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.12.032>
104. *Gutsaeva DR, Suliman HB, Carraway MS, Demchenko IT, Piantadosi CA* (2006) Oxygen-induced mitochondrial biogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience* 137(2): 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.061>
105. *Piantadosi CA, Suliman HB* (2012) Redox regulation of mitochondrial biogenesis. *Free Radic Biol Med* 53(11): 2043–2053. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.014>
106. *Matalon S, Hardiman KM, Jain L, Eaton DC, Kotlikoff M, Eu JP, Sun J, Meissner G, Stamler JS* (2003) Regulation of ion channel structure and function by reactive oxygen-nitrogen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(6): L1184–L1189. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00281.2003>
107. *He H, Li X, He Y* (2019) Hyperbaric oxygen therapy attenuates neuronal apoptosis induced by traumatic brain injury via Akt/GSK3 β / β -catenin pathway. *Neuropsychiatr Dis Treat* 15: 369–374. <https://doi.org/10.2147/NDT.S183632>
108. *Cozene B, Sadanandan N, Gonzales-Portillo B, Saft M, Cho J, Park YJ, Borlongan CV* (2020) An Extra Breath of Fresh Air: Hyperbaric Oxygenation as a Stroke Therapeutic. *Biomolecules* 10: 1279. <https://doi.org/10.3390/biom10091279>
109. *Close GL, Kayani AC, Ashton T, McArdle A, Jackson MJ* (2007) Release of superoxide from skeletal muscle of adult and old mice: an experimental test of the reductive hotspot hypothesis. *Aging Cell* 6(2): 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00277.x>
110. *Schiavo S, Richardson D, Santa Mina D, Buryk-Iggers S, Uehling J, Carroll J, Clarke H, Djaiani C, Gershinsky M, Katznelson R* (2020) Hyperbaric oxygen and focused rehabilitation program: A feasibility study in improving upper limb motor function after stroke. *Appl Physiol Nutr Metab* 45(12): 1345–1352. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0124>
111. *Sankaran R, Radhakrishnan K, Sundaram KR* (2019) Hyperbaric oxygen therapy in patients with hypoxic ischemic encephalopathy. *Neurol India* 67(3): 728–731. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.263236>
112. *Liang XX, Hao YG, Duan XM, Han XL, Cai XX* (2020) Hyperbaric oxygen therapy for post-stroke depression: A systematic review and meta-analysis. *Clin Neurol Neurosurg* 195: 105910. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.105910>
113. *Golan H, Makogon B, Volkov O, Smolyakov Y, Hadanny A, Efrati S* (2019) Imaging-based predictors for hyperbaric oxygen therapy outcome in post-stroke patients. Report 1. *Med Hypotheses* 136: 109510. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.109510>
114. *Matson MP* (2008) Hormesis defined. *Ageing Res Rev* 7(1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
115. *Brugniaux JV, Coombs GB, Barak OF, Dujic Z, Sekhon MS, Ainslie PN* (2018) Highs and lows of hyperoxia: physiological, performance, and clinical aspects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 315(1): R1–R27. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00165.2017>
116. *Thom SR, Bhopale VM, Velazquez OC, Goldstein LJ, Thom LH, Buerk DG* (2006) Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(4): H1378–H1386. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00888.2005>
117. *Hachmo Y, Hadanny A, Abu Hamed R, Daniel-Kotovsky M, Catalogna M, Fishlev G, Lang E, Polak N, Doenyas K, Friedman M, Zemel Y, Bechor Y, Efrati S* (2020) Hyperbaric oxygen ther-

- apy increases telomere length and decreases immunosenescence in isolated blood cells: a prospective trial. *Aging* (Albany NY) 12(22): 22445–22456.
<https://doi.org/10.18632/aging.202188>
118. Demchenko IT, Zhilyaev SYu, Alekseeva OS, Krivchenko AI, Piantadosi CA, Gasier HG (2019) Increased Antiseizure Effectiveness with Tiagabine Combined with Sodium Channel Antagonists in Mice Exposed to Hyperbaric Oxygen. *Neurotox Res* 36(4): 788–795.
<https://doi.org/10.1007/s12640-019-00063-5>

Mechanisms of Physiological and Neurotoxic Action of Hyperbaric Oxygen

I. T. Demchenko^a, S. Yu. Zhilyaev^a, T. F. Platonova^a, and O. S. Alekseeva^{a, *}

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

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

During the period of use of hyperbaric oxygen (HBO₂) in medical medicine and in scuba diving, extensive knowledge has been accumulated about the mechanisms of its biological action. In the present work, we analyze the experimental data of recent years related to the cellular and molecular mechanisms of the physiological and neurotoxic effects of hyperbaric oxygen. New data on the physiological action of HBO₂ concern the mechanisms of hyperoxic vasoconstriction and baroreflex activation in hyperoxia. The toxic effect of hyperbaric oxygen is realized through the intensive production of reactive oxygen and nitrogen species, which cause post-translational modification of proteins responsible for neuronal electrogenesis and synaptic transmission in the GABAergic system of the brain.

Keywords: hyperbaric oxygen, reactive oxygen and nitrogen species, hyperoxic vasoconstriction, hyperoxic baroreflex, oxygen convulsions, brain GABAergic system

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**КОРРЕКЦИЯ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ И СОСТОЯНИЯ
МИКРОГЛИИ РЕКОМБИНАНТНЫМ АНТАГОНИСТОМ РЕЦЕПТОРА IL-1
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ**

© 2022 г. Е. Е. Фомичева¹, С. Н. Шанин¹, Т. А. Филатенкова¹, Н. С. Новикова¹,
А. С. Дятлова¹, А. М. Ищенко², Н. Б. Серебряная^{1,*}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: serebr@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2022 г.

После доработки 01.07.2022 г.

Принята к публикации 30.07.2022 г.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) – многофакторное заболевание, которое может приводить к развитию ряда неврологических заболеваний. Для коррекции нарушений физиологических функций используются противовоспалительные цитокины, в частности рецепторный антагонист IL-1 (IL-1RA). Цель работы – оценить эффективность препарата рекомбинантного (r)IL-1RA для коррекции посттравматического нейровоспаления. ЧМТ у крыс моделировали путем падения груза массой 115 г с высоты 120 см в центр теменной области, препарат в дозе 50 мг/кг вводили подкожно через 60 мин после травмы. Исследовали уровни кортикостерона в крови и поведенческие реакции в тесте “Открытое поле”. Для характеристики активационного паттерна микроглии оценивали морфологические изменения Iba1⁺-клеток в различных отделах мозга. Подсчет общего количества Iba1⁺ клеток микроглии на 7-е сутки после ЧМТ показал, что у животных, получавших rIL-1Ra, количество клеток микроглии было существенно большим, чем у контрольных животных, однако степень их активации была существенно меньшей. Исследования нарушений функций ЦНС после ЧМТ показали, что двигательная и ориентировочно-исследовательская активности были значительно угнетены, что, совместно с нарушением эмоционального статуса животных, свидетельствует о развитии у контрольных крыс неврологического дефицита. У животных, пролеченных rIL-1Ra, изменения поведенческих характеристик были менее выражены. Снижение неврологического дефицита у пролеченных животных было напрямую связано с нормализацией состояния микроглии. Полученные в работе данные свидетельствуют, что применение rIL-1RA через 1 ч после ЧМТ позволяет скорректировать двигательную, ориентировочно-исследовательскую активности и снизить активацию микроглии в различных отделах ЦНС.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, кортикостерон, rIL-1RA, поведение, микроглия

DOI: 10.31857/S0869813922100077

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) – одна из важных причин заболеваемости в России и развитых странах, которая может приводить к развитию неврологических заболеваний и инвалидности. Различные последствия ЧМТ могут проявляться как изменения личности, когнитивные проблемы, нарушения моторики и иммунной системы при снижении качества жизни [1]. Неврологические исходы ЧМТ в зна-

чительной степени зависят от вторичных последствий, которые возникают в ходе развития посттравматического процесса. Причиной развития и поддержания нейровоспаления, формирования неврологического дефицита может быть вторичное повреждение, обусловленное ишемией, эксайтотоксической гибелью нейронов и продукцией свободных радикалов.

Воспалительные цитокины, включая интерлейкин-1 ($IL-1\alpha$ и $IL-1\beta$), являются важными организаторами нейровоспаления. Основной функциональной мишенью этих эндогенных цитокинов является рецептор $IL-1$ типа 1 ($IL-1R1$), блокирующим лигандом которого является антагонист рецептора $IL-1$ ($IL-1RA$) [2]. В мозге функциональная экспрессия $IL-1R1$ была продемонстрирована в астроцитах, микроглии, нейронах и эндотелиальных клетках [3]. Регуляторная роль $IL-1R1$ в активации врожденной иммунной системы делает его идеальным кандидатом для блокирования последующих эффектов $IL-1$, в том числе при нейровоспалении [4]. Препараты рекомбинантного рецепторного антагониста $IL-1$ ($IL-1RA$) считаются перспективными при лечении ЧМТ. Показано, что введение $IL-1RA$ при церебральной ишемии у экспериментальных животных обеспечивает нейропротекторный эффект: улучшается течение восстановительного периода в связи с улучшением кровоснабжения мозга и его энергетического и пластического метаболизма [5, 6]. Показано, что при введении $IL-1RA$ после экспериментальной ЧМТ угнетается высокая экспрессия провоспалительных цитокинов, улучшается когнитивная функция [7], уменьшаются потеря объема ткани в поврежденной коре мозга и повреждение аксонов, улучшается пространственная память [8, 9], предотвращается развитие судорожного синдрома у предрасположенных к нему животных [10]. Препарат человеческого $IL-1RA$ (анакинра) проходит клинические испытания у больных с ЧМТ [8]. Показано, что введение 100 мг анакинры подкожно один раз в день в течение 5 дней пациентам с тяжелой ЧМТ является безопасным, препарат проникает в плазму и цереброспинальную жидкость, значительно увеличивая уровни $IL-1RA$ в головном мозге и в плазме крови, угнетая нейровоспалительный ответ [9]. При проведении цитируемых клинических испытаний было выявлено, что лечение способствует появлению у макрофагов склонности к провоспалительному фенотипу M1, который характеризуется повышенными уровнями экспрессии цитокинов GM-CSF и $IL-1\beta$, тогда как уровни $IL-4$ и $IL-10$, связанные с противовоспалительным фенотипом M2-типа, снижаются [2, 11]. Эти результаты противоречат исследованиям, показавшим снижение уровней $IL-1\beta$ как в группах пролеченных пациентов [10], так и в экспериментальных исследованиях [5, 6]. Несоответствие результатов различных исследований, неожиданность ряда полученных данных свидетельствуют, что современных знаний о механизме действия $IL-1RA$ и его препаратов недостаточно и требуется дальнейшее изучение.

Одной из проблем, связанных с использованием $IL-1RA$, является узкое терапевтическое окно в раннем посттравматическом периоде. Так, при введении препарата через 2 ч, а не через 5 или 15 мин после травмы, было отмечено уменьшение нейропротекторного действия препарата [12].

Настоящее исследование предпринято с целью оценить эффективность введения препарата $IL-1RA$ в посттравматическом периоде для коррекции развивающегося нейровоспаления, вызванного экспериментальной ЧМТ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 60 крысах-самцах породы Вистар массой 280–330 г. Животных содержали в условиях вивария при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота, свободным доступом к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Все процедуры с

животными проводились в одно и то же время. В качестве модели механической травмы головного мозга использовали модель “падающего груза”, также известную как “модель ударного ускорения” в собственной модификации, вызывающей в основном диффузное повреждение мозга [13]. Груз массой 115 г падал с высоты 120 см для нанесения травмы средней тяжести в центр теменной части головы животного. Падение груза направлялось при помощи цилиндрической трубки с внутренним диаметром 20 мм, которая была жестко закреплена на штативе двумя держателями и центрирована над головой крысы. Расстояние между концом трубки и головой животного составляло 7 см. Перед нанесением травмы животные получали наркоз из расчета 3–5 мл медицинского эфира на 1 кг массы тела в смеси с атмосферным воздухом. По завершении опыта животных выводили из эксперимента путем декапитации с соблюдением правил эвтаназии согласно требованиям п. 12 Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к животным. Эксперименты проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики” и Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”. Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены на заседании биоэтической комиссии Института экспериментальной медицины.

Препарат rIL-1RA (ГосНИИОЧБ, Санкт-Петербург, РФ зарегистрирован в Государственном реестре лекарственных средств как ЛСР-007452/10 от 30.07.2010) вводили подкожно в дозе 50 мг/кг массы тела животного в 0.5 мл изотонического раствора NaCl через 1 ч после ЧМТ и еще дважды в течение последующих двух суток (всего три инъекции). Отбор материала для исследования осуществлялся на 3-и, 7-е и 14-е сутки после ЧМТ. Контрольные животные получали изотонический раствор NaCl.

Для исследования эффектов действия препарата rIL-1RA были сформированы следующие экспериментальные группы:

- 1 – контрольные животные (контроль, $n = 20$);
- 2 – животные, перенесшие ЧМТ (ЧМТ, $n = 20$);
- 3 – опытные животные, перенесшие ЧМТ и получавшие rIL-1Ra (ЧМТ + rIL-1Ra, $n = 20$).

В каждой опытной группе животных (группы 2 и 3) выделяли 3 подгруппы по 5 крыс для исследования поведения и уровня кортикостерона на 3-и, 7-е и 14-е сутки после ЧМТ. В группе контрольных животных 5 крыс были интактными, а 3 подгруппы по 5 особей использовали как контроль для каждого этапа эксперимента. Две дополнительные подгруппы выделяли в группах опытных животных для проведения морфологических исследований мозга на 7-е сутки после ЧМТ, используя соответствующий контроль (все подгруппы также по 5 крыс).

Изучение поведенческих реакций животных. Изучение нарушений поведенческих реакций и изменений функций ЦНС необходимо для понимания процессов, происходящих в мозге после ЧМТ и выявления неврологического дефицита [14]. Регистрация поведенческих реакций животных проводилась в тесте “Открытое поле”. Установа “Открытое поле” представляла собой открытую ярко-освещенную круглую арену диаметром 1 м с высотой стенок 40 см, расчерченную на центральные и периферические сектора, с отверстиями в дне. Животное помещали в центр арены и регистрировали поведение в течение 5 мин. Каждое животное помещалось в арену однократно с целью избежать эффекта привыкания к условиям теста. Поведенческие реакции, такие как нахождение в тех или иных секторах открытого поля, средняя скорость передвижения, общая длина пройденного пути (пробег, дистанция), а также показатели вертикальной двигательной активности и груминга регистрировали и анализировали с использованием программного обеспечения Video-Mot 2 (TSESystems, Германия).

Определение концентрации кортикостерона в крови животных проводилось с помощью наборов для иммуноферментного анализа фирмы DRG Diagnostic (Германия) согласно протоколу, предложенному фирмой-производителем. Кровь собирали после декапитации и выделяли сыворотку путем центрифугирования при температуре 4–6°C.

Морфологические исследования. Работа выполнена на 15 животных через 7 суток после ЧМТ. Крыс подвергали эвтаназии при последовательном внутрибрюшном введении золетил–силазин (40 мг/кг + 10 мг/кг), транскардиальной перфузией физиологическим раствором с гепарином (20 ед/мл), затем фиксирующим раствором, содержащим 4%-ный параформальдегид на 0.1 М PBS (рН 7.4) и 0.2%-ную пикриновую кислоту. Через 2 ч мозг извлекали из черепа животного с последующей дофиксацией в 4%-ном параформальдегиде в течение 12 ч при комнатной температуре и уравновешивали в криозащитном растворе 20%-ной сахарозы при комнатной температуре в течение 2–4 ч. Мозг замораживали при температуре –26°C и с помощью замораживающего столика (Миконта-2), установленного на санном микротоме, были созданы корональные срезы толщиной 30 мкм. Срезы помещали в криопротектор до иммуногистохимического окрашивания. Для выявления клеток микроглии использовали первичные антитела: Rabbit anti-Iba1 (Abcam) в разведении 1 : 2000, инкубация длилась 2 суток при 4°C, затем проводили последовательные этапы инкубации со вторичными биотинилизованными антителами (goat anti-rabbit antibodies, Abcam) 1 : 1000 и авидин-пероксидазой (Sigma) 1 : 300. После каждой инкубации срезы промывали PBS 3 раза по 5 мин. Визуализацию иммуногистохимического окрашивания проводили раствором DAB (Abcam), Срезы мозга от –2.85 до –4.20 мм от брегмы (bregma), что соответствует с 29-го по 32-й уровни согласно атласу мозга крыс Swanson [15], анализировали на микроскопе Leica 2500 при увеличении $\times 10$ и $\times 40$. Полученные изображения анализировали при помощи программного обеспечения ВидеоТест Морфология 5.2.

Подсчет клеток микроглии. Количество Iba1-позитивных клеток микроглии подсчитывали на 5 срезах от каждого животного в нескольких полях зрения (2–4) для каждой исследованной зоны мозга с пересчетом на одно поле зрения площадью 0.62 мм². Степень активации микроглии оценивали как процентное отношение количества активированных клеток микроглии к общему количеству Iba1-позитивных клеток микроглии. Критерием активации клеток микроглии являлось изменение их морфологических характеристик: трансформация отростчатой микроглии в амeboидную с увеличением размеров тела клетки с укорочением и утолщением первичных отростков [16]. Активированными клетками микроглии считали Iba1-позитивные клетки, площадь перинуклеарного пространства которых превышала 30 мкм², так как размер неактивированных клеток микроглии не превышает 6 мкм в длину и 3 мкм в ширину [17]. Для характеристики распределения активированной микроглии в исследуемых областях головного мозга были сформированы классы, учитывающие процент активированной микроглии относительно общего количества микроглиальных клеток: “±” – единичные активированные клетки микроглии – менее 5%; “+” – от 5 до 10%; “++” – от 11 до 30%; “+++” – более 30%.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ STATISTICA for Windows (версия 7). Количественные показатели оценивались на соответствие нормальному распределению с помощью критериев Шапиро–Уилка. Результаты представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое значение, SD – стандартное отклонение. При сравнении показателей трех групп использовали поправку Бонферрони. В случае несоответствия нормальному распределению использовали U-критерий Манна–Уитни (результаты представлены графически как медианы, верхний и нижний квартили (Q1, Q3) и минимальное и максимальное значение выборки). Различия сравниваемых параметров считали значимыми при $p < 0.05$.

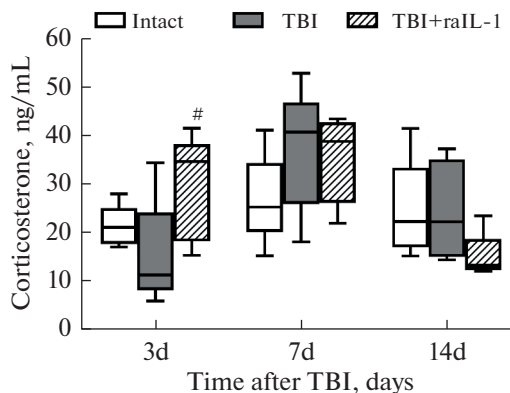


Рис. 1. Изменения уровня кортикостерона у животных на 3-и, 7-е и 14-е сутки после ЧМТ и введения препарата rIL-1Ra.

– $p < 0.05$ по сравнению с показателем у травмированных нелеченых животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ЧМТ явилась существенным стрессогенным событием, о чем свидетельствуют колебания уровня кортикостерона в крови травмированных животных (рис. 1). На 3-й день после ЧМТ у животных, не получавших лечения, уровень кортикостерона был существенно ниже, чем у контрольных животных, но резко повышался к 7-му дню после травмы и возвращался к уровню контрольных животных. Однако у животных, получавших rIL-1RA, наблюдался другой паттерн изменения уровня кортикостерона: на 3-й день после травмы уровень этого гормона был существенно выше, чем у травмированных нелеченых крыс, но не отличался от показателей контрольных животных на всех сроках наблюдения (рис. 1). Представленные на рис. 1 данные свидетельствуют, что динамика уровня кортикостерона в обеих группах отличается от типичной стресс-реакции (гормональный пик с 4-кратным подъемом уровня гормона через 2 ч после травмы с последующим падением и нормализацией к 14-му дню после травмы) [18].

Учитывая, что перенесенный стресс связан с потерей массы тела [19], был прослежен характер изменения массы тела в исследуемых группах животных (рис. 2). Показано, что на 3-и сутки после ЧМТ наблюдалось значимое снижение массы тела у травмированных животных и у крыс, получавших rIL-1RA, однако падение массы тела на 7-е и 14-е дни после ЧМТ в группе нелеченых крыс было несколько большим.

Сопоставление уровней кортикостерона и показателей массы тела свидетельствует, что более высокие концентрации кортикостерона на 3-и сутки после ЧМТ у пролеченных животных были ассоциированы с меньшим падением массы тела на 3-и, 7-е и 14-е сутки, чем в группе нелеченых животных после ЧМТ, это, по нашему мнению, свидетельствует о менее выраженной стресс-реакции при проведении 3-дневного курса rIL-1RA.

Изучение поведения животных в тесте “Открытое поле” показало, что у крыс после ЧМТ горизонтальная двигательная активность по показателям пробега (дистанции) и скорости пробега была достоверно снижена на 7-е и 14-е дни после травмы по сравнению с показателями двигательной активности контрольных животных (табл. 1). У животных, пролеченных препаратом rIL-1RA, показатели двигательной активности не отличалась от таковых у контрольных животных и были достоверно выше, чем у нелеченых крыс на 7-и и 14-е сутки после ЧМТ.

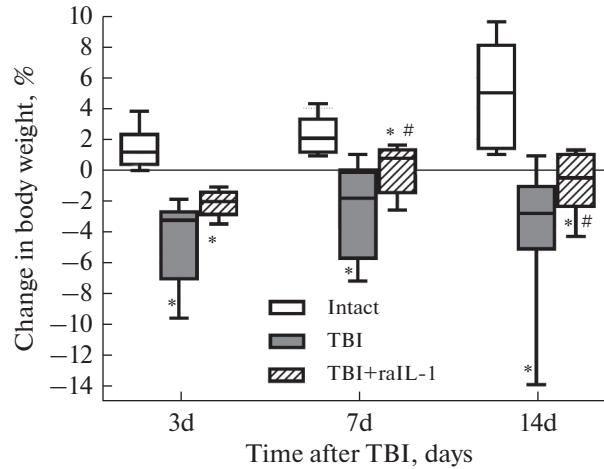


Рис. 2. Изменения массы тела у животных на 3-и, 7-е и 14-е сутки после ЧМТ и введения rIL-1Ra.

* – $p < 0.05$ по сравнению с показателем у контрольных животных, # – $p < 0.05$ по сравнению с показателем у травмированных животных.

Ориентировочно-исследовательскую реакцию (ОИР) у травмированных крыс оценивали по числу заглядываний в “норки”, вертикальных стоек (вертикальная двигательная активность) и количеству выходов в центр поля (табл. 2). Показано, что у крыс после ЧМТ ориентировочно-исследовательская реакция по всем 3 показателям была существенно угнетена на 7-й день после травмы по сравнению с этими показателями у контрольных животных, а по одному из показателей (посещение центра поля) оставалась сниженной и на 14-й день после травмы. Но у животных, пролеченных rIL-1Ra, показатели ОИР не угнетались и соответствовали параметрам контрольных животных, причем на 7-й день после ЧМТ все показатели были достоверно выше, чем у нелеченых травмированных крыс.

Об эмоциональной реакции и состоянии скрытой тревожности у крыс судили по времени пребывания в центре поля и по количеству и длительности актов груминга (табл. 3). Показано, что время пребывания в центре поля было значительно снижено у травмированных нелеченых животных на 7-е и 14-е дни после травмы, а в

Таблица 1. Горизонтальная двигательная активность животных на 3-и, 7-е и 14-е сутки после нанесения ЧМТ и введения препарата IL-1RA

Группы животных	Длина пробега (дистанция), м	Скорость пробега, см/с
Контроль	15.5 ± 2.5	5.2 ± 0.9
ЧМТ		
3-и сутки	17.1 ± 6.9	5.7 ± 2.3
7-е сутки	8.0 ± 2.9* ($p < 0.01$)	2.7 ± 0.9* ($p < 0.01$)
14-е сутки	12.2 ± 4.1* ($p < 0.05$)	4.1 ± 0.7* ($p < 0.05$)
ЧМТ + rIL-1RA		
3-и сутки	17.3 ± 3.7	5.8 ± 1.2
7-е сутки	13.2 ± 3.5# ($p < 0.05$)	4.4 ± 1.2# ($p < 0.05$)
14-е сутки	15.4 ± 2.6# ($p < 0.05$)	5.1 ± 0.9# ($p < 0.05$)

В табл. 1–4 обозначение * – статистические данные сравнения с показателями контрольных животных; # – статистические данные сравнения с травмированными животными в те же сроки после ЧМТ.

Таблица 2. Ориентировочно-исследовательская активность животных на 3-и, 7-е и 14-е сутки после ЧМТ и введения препарата IL-1RA

Группы животных	Вертикальные стойки	Заглядывания в норки	Посещения центра поля
Контроль	19.3 ± 7.0	9.0 ± 2.4	7.0 ± 2.8
ЧМТ			
3-и сутки	20.9 ± 8.8	14.0 ± 9.4	5.5 ± 1.3
7-е сутки	10.8 ± 6.8* (<i>p</i> < 0.05)	1.8 ± 1.4* (<i>p</i> < 0.05)	2.8 ± 0.5* (<i>p</i> < 0.05)
14-е сутки	16.5 ± 3.5	6.8 ± 3.1	4.3 ± 2.3* (<i>p</i> < 0.05)
ЧМТ+ IL-1RA			
3-и сутки	18.0 ± 6.7	11.5 ± 5.3	7.8 ± 2.2
7-е сутки	19.4 ± 7.5# (<i>p</i> < 0.05)	7.4 ± 4.1# (<i>p</i> < 0.05)	5.0 ± 1.3# (<i>p</i> < 0.05)
14-е сутки	18.7 ± 3.9	8.0 ± 2.7	9.0 ± 2.4# (<i>p</i> < 0.01)

Обозначения те же, что в табл. 1.

Таблица 3. Время нахождения в центре открытого поля, количество актов и продолжительность груминга на 3-и, 7-е и 14-е сутки после нанесения ЧМТ и введения препарата gIL-1RA

Группы животных	Время в центре, с	Груминг	Время груминга, с
Контроль	21.7 ± 13.1	5.0 ± 2.6	27.5 ± 13.7
ЧМТ			
3-и сутки	18.6 ± 9.6	4.8 ± 3.2	15.80 ± 14.3
7-е сутки	5.0 ± 2.5* (<i>p</i> < 0.05)	6.0 ± 0.8	77.3 ± 18.0* (<i>p</i> < 0.01)
14-е сутки	9.3 ± 5.1* (<i>p</i> < 0.05)	5.8 ± 3.1	59.3 ± 25.4* (<i>p</i> < 0.05)
ЧМТ+ IL-1RA			
3-и сутки	26.5 ± 5.5	3.9 ± 4.5	22.9 ± 24.2
7-е сутки	15.0 ± 7.9# (<i>p</i> < 0.05)	6.0 ± 1.3	31.6 ± 16.0# (<i>p</i> < 0.01)
14-е сутки	24.0 ± 5.6# (<i>p</i> < 0.05)	2.0 ± 1.6# (<i>p</i> < 0.05)	16.3 ± 13.5# (<i>p</i> < 0.05)

Обозначения те же, что в табл. 1.

группе пролеченных крыс в течение всего периода наблюдения этот показатель был существенно выше и не отличался от показателя контрольных животных.

У травмированных крыс количество актов груминга практически не отличалось от таковых у контрольных животных на 3-и, 7-е и 14-е дни после ЧМТ, однако длительность груминга значительно возрастала на 7-е и 14-е дни после травмы. При этом у пролеченных животных количество актов груминга на 14-е сутки после ЧМТ было меньше, чем у нелеченных крыс, а их продолжительность на 7–14-е дни была существенно более короткой.

Таким образом, представленные данные о характере изменения двигательной, ориентировочно-исследовательской активности, а также об эмоциональном статусе животных свидетельствуют, что после ЧМТ у крыс развивались выраженные поведенческие нарушения, что особенно ярко проявилось на 7-й день после травмы (когда были изменены 7 из 8 показателей), причем по 4 из 8 показателей нарушения сохранялись на 14-й день после ЧМТ. У животных, пролеченных gIL-1RA, поведенческие нарушения не были значимыми в течении всего периода наблюдения.

Для получения данных, характеризующих нейровоспаление, анализировали количество и степень активации Iba1-позитивных клеток микроглии в препаратах срезов мозга в зонах, отмеченных на рис. 3.

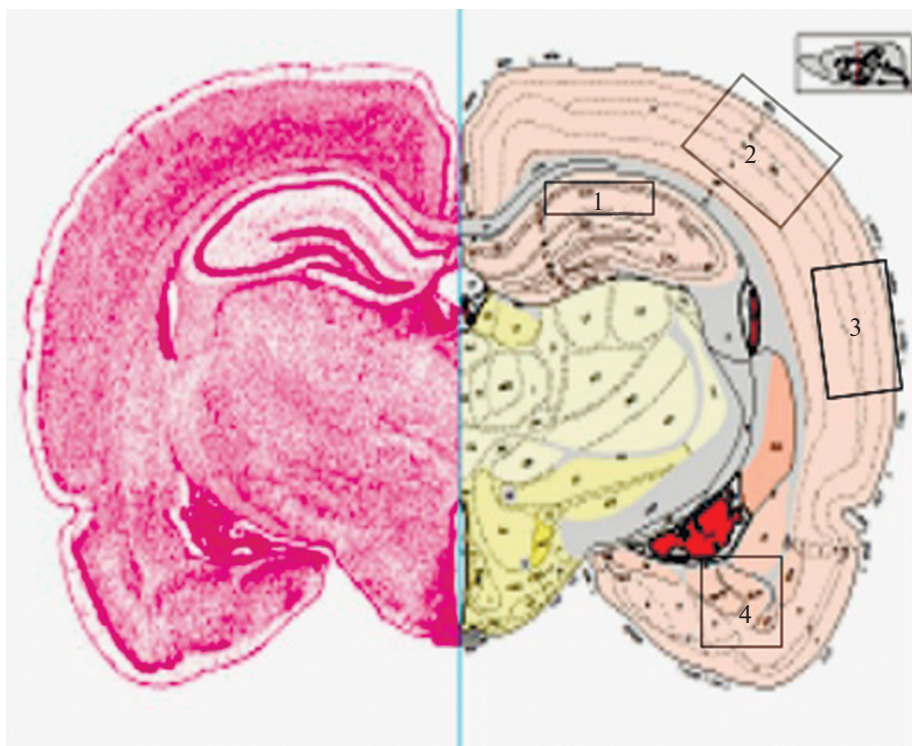


Рис. 3. Схема среза мозга 31-го уровня: 1 – гиппокамп зона CA1, 2 – первичная соматосенсорная зона коры (SSp), 3 – височная ассоциативная зона коры (AUD), 4 – амигдала, область базолатерального и базомедиального ядер (BLAp и BMAp) [15].

На 7-е сутки после ЧМТ у животных, получавших gIL-1RA , количество Iba1-позитивных клеток микроглии во всех исследованных областях мозга было существенно большим, чем у контрольных и травмированных нелеченых животных (табл. 4). При этом у пролеченных животных на 7-й день после травмы микроглия во всех исследованных областях мозга имела морфологические черты, свойственные нормальной неактивированной микроглии, а активированная микроглии присутствовала только в незначительном количестве.

Выявленные изменения иллюстрируют микрофотографии участков височной ассоциативной коры головного мозга у животных изученных групп с указанием на активированные и неактивированные клетки микроглии (рис. 4).

Суммарно, выявленные изменения указывают, что протективные и репаративные процессы в мозге крыс после ЧМТ, пролеченных препаратом gIL-1RA , протекают эффективнее и быстрее, по сравнению с таковыми у контрольных животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что ЧМТ индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов, которые влияют на нейрональные, гормональные и поведенческие реакции. В частности, $\text{IL-1}\beta$ активирует гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось, а также метаболизм норадреналина и индоламина в головном мозге [20]. Показано, что IL-1RA индуцируется теми же сигналами, которые характерны для синтеза и вы-

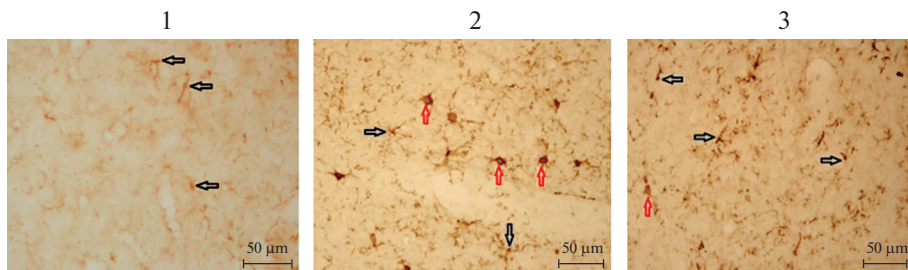


Рис. 4. Клетки микроглии височной ассоциативной коры головного мозга крыс на 7-е сутки после ЧМТ: 1 – контроль, 2 – ЧМТ, 3 – ЧМТ + IL-1RA. Калибровочный маркер соответствует 50 мкм. Неактивированные клетки микроглии отмечены черными стрелками, активированные клетки микроглии – красными стрелками. Иммуногистохимическое окрашивание, маркер Iba1; $\times 40$.

свобождения IL-1, а также самим IL-1, однако экспрессия IL-1RA существенно отличается от экспрессии IL-1 α и IL-1 β по времени [21], вследствие чего IL-1RA не отменяет развившуюся воспалительную реакцию, а только модулирует/смягчает ее течение. Полученные данные показали, что при использовании препарата rIL-1RA через 60 мин и в течение 2 последующих дней после ЧМТ, направленность изменения концентрации кортикостерона на 3-и сутки существенно отличалась от показателей травмированных нелеченых животных. Изучение влияния препаратов IL-1RA на уровни АКТГ и кортикостерона в плазме крови крыс показало, что внутрибрюшинное введение даже больших доз препарата не снижает повышенные уровни перечисленных стресс-гормонов [22], что совпадает с полученными нами результатами. Однако, учитывая цикличность посттравматического процесса и развитие “вторичного воспаления”, важно отметить, что IL-1RA может блокировать повторные/дополнительные высвобождения IL-1 β в ЦНС и плазме крови [20, 23], влияя на более поздние этапы посттравматической болезни. Снижение массы

Таблица 4. Количество Iba1-позитивных клеток микроглии на площади 0.62 мм² и степень их активации в различных отделах мозга на 7-е сутки после ЧМТ

Группы животных	Отделы мозга			
	Гиппокамп СА1	Соматосенсорная кора	Височная ассоциативная кора	Амигдала
Контроль				
Количество клеток	9.4 \pm 0.9	5.7 \pm 1.1	6.9 \pm 0.75	12.2 \pm 1.3
Степень активации	\pm	–	\pm	\pm
ЧМТ				
Количество клеток	11.1 \pm 1.2	8.7 \pm 2.9	13.6 \pm 4.6* ($p < 0.001$)	14.0 \pm 2.6
Степень активации	++	++	+++	+++
ЧМТ + rIL-1RA				
Количество клеток	26.0 \pm 6.2 *($p < 0.001$) #($p < 0.001$)	23.3 \pm 7.1 *($p < 0.001$) #($p < 0.005$)	28.9 \pm 4.4 *($p < 0.001$) #($p < 0.001$)	30.4 \pm 5.8 *($p < 0.001$) #($p < 0.001$)
Степень активации	+	\pm	+	+

Представленные зоны соответствуют зонам, выделенным на схеме мозга рис. 3 [15], обозначения *, # те же, что в табл. 1.

тела у травмированных животных обусловлено системной катаболической реакцией, которая истощает как жировую, так и мышечную массу и обусловлена существенным повышением уровня провоспалительных цитокинов, таких как TNF, IL-1 α , IL-6 [23]. Учитывая эту закономерность, можно утверждать, что существенно менее выраженное снижение массы тела у крыс, получавших rIL-1RA, по сравнению с нелечеными травмированными животными, свидетельствует о подавлении у них активности воспалительного процесса после ЧМТ.

Исследования нарушений функций ЦНС после ЧМТ на основе поведенческих тестов показало, что двигательная и ориентировочно-исследовательская активность были значительно угнетены, также нарушался эмоциональный статус животных. Полученные данные свидетельствуют, что у травмированных крыс развивался неврологический дефицит, проявляющийся на протяжении всего периода наблюдения, что это согласуется с литературными данными [24]. Некоторые авторы отмечают, что характер двигательной активности животных в постстрессорный период (в том числе после ЧМТ) в тесте “Открытое поле” определялся изменениями концентрации кортикостерона в крови [25]. Так, количество пересечений центра открытого поля и количество обследованных предметов были выше у крыс со сниженным постстрессовым уровнем гормона. В то же время длительность груминга была выше у крыс с высоким содержанием кортикостерона в крови, чем у крыс с низким уровнем гормона в постстрессорный период. Ранее были опубликованы результаты исследования в тестах “Открытого поля” поведенческих особенностей травмированных животных и животных, получивших rIL-1RA профилактически перед нанесением ЧМТ (в обоих экспериментах использовалась доза препарата 15 мг/кг) [5, 6]. На модели ЧМТ средней тяжести у крыс было показано, что профилактическое применение rIL-1RA улучшало течение восстановительного периода, нормализуя показатели функционального состояния ЦНС (мышечный тонус и координация движений, двигательную и исследовательскую активности, эмоциональные реакции) в реабилитационном периоде ЧМТ. Такое активирующее действие rIL-1RA на ЦНС авторы связывают со способностью данного цитокина повышать церебральное содержание катехоламинов (норадреналина и адреналина), стимулируя адренергическую нейротрансмиссию [6]. В экспериментах с окклюзией обеих сонных артерий с последующей их реперфузией rIL-1RA примерно в 3 раза уменьшал снижение кровотока. При этом rIL-1RA также способствовал уменьшению acidоза в крови, оттекающей от головного мозга, снижая деструкцию нейронов и содержание IL-1 β [5]. При сопоставлении полученных нами данных с вышеприведенными результатами других исследований можно отметить, что использование трехкратного введения препарата rIL-1RA в дозе 50 мг/кг, начатое через 1 ч после ЧМТ, приводит к эффектам, сходным с теми, что были выявлены при профилактическом введении препарата (в дозе 15 мг/кг), что, безусловно, важно для его дальнейшего клинического использования.

В исследовании Greenhalgh и соавт. [26] было показано, что при хроническом посттравматическом нейровоспалении, осложненном эпилепсией, достичь позитивного эффекта у грызунов позволяет доза 100 мг/кг rIL-1RA. Показано, что эта доза обеспечивает проникновение через гематоэнцефалический барьер и приводит к устойчивым высоким концентрациям IL-1RA в плазме и спинномозговой жидкости, обеспечивает проникновение в ткань головного мозга в области нарушения гематоэнцефалического барьера, способствуя нейропротекции на моделях повреждения ЦНС [27]. Важно отметить, что в клинических исследованиях препаратов rIL-1RA пациентам вводится доза 100 мг на одно введение в сутки, что значительно меньше дозы, используемой для животных [10, 28], поэтому выбор нами относительно небольшой дозы препарата представляется вполне оправданным.

Исследования способности препаратов rIL-1RA проникать через гематоэнцефалический барьер активно продолжаются. В модельных экспериментах выявлена способность препарата проходить через эндотелиальный монослой в клинически значимых концентрациях [29]. Кроме того, показано, что даже если rIL-1RA не проникает через гематоэнцефалический барьер, он может модулировать состояние микроглии опосредованно сигналами от клеток эндотелия [30] или стромы и эпителия сосудистого сплетения [31]. Такая опосредованная передача цитокиновых сигналов также обеспечивает изменения баланса IL-1/IL-1RA в ткани мозга и способствует снижению активности воспаления.

Кроме вводимой дозы препарата, существенное влияние на эффективность терапии оказывает время его введения по отношению к моменту травмы. Предполагают, что между началом каскада вторичных повреждений и моментом, когда эти изменения становятся необратимыми, может существовать окно возможностей для фармакологических воздействий, которые могут улучшить исходы заболевания [32], и крайне важно определить длительность такого окна для использованного цитокинового препарата. Полученные нами данные подтверждают, что выбранный нами режим терапии способен существенно улучшать течение раннего посттравматического периода при ЧМТ у крыс.

Важно отметить, что снижение неврологического дефицита у пролеченных животных, выявленное в поведенческих тестах, напрямую связано с существенно лучшим состоянием клеток ЦНС, а именно микроглии. Активированные клетки микроглии в различных отделах мозга синтезируют различные цитокины и экспрессируют определенные маркеры, которые позволяют выделять условные активационные фенотипы: M0, M1 и M2a, b, c, d [33]. Показано, что для микроглии в состоянии M0 и M1 (связанном с продукцией провоспалительных цитокинов) характерным маркером является адаптерная молекула связывания ионизированного кальция 1 (Iba1) [34]. Подсчет количество Iba1-положительных клеток микроглии в нескольких областях мозга крыс на 7-е сутки после ЧМТ показал, что у животных, получавших rIL-1RA, количество Iba1-позитивных клеток микроглии было существенно большим, чем у контрольных и травмированных нелеченых животных, однако степень их активации была более низкой (табл. 4, рис. 4). Такое состояние микроглии, важнейшего источника цитокинов в ЦНС, свидетельствует, по нашему мнению, о меньшей выраженности нейровоспаления, поскольку увеличение плотности клеток может быть связано с транзиторным повышением миграционной активности микроглии в направлении очагов повреждения [35].

Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют, что применение rIL-1RA (курс из 3 ежедневных инъекций в дозе 50 мг/кг массы, начатый через 60 мин после ЧМТ) позволило животным: лучше перенести последствия травматического стресса; скорректировать двигательную, ориентировочно-исследовательскую активности и улучшить эмоциональный статус животных; снизить активацию микроглии в различных отделах ЦНС, что свидетельствует о проявлении нейропротективных свойств данного цитокинового препарата.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в соответствии с плановыми исследованиями (Гос. задание) по теме “Патофизиологические основы нарушений взаимодействия нервной и иммунной систем и поиск инновационных путей коррекции различных форм патологии” 2019–2021 гг.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с опубликованием этой статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.Н.Б. — идея работы, общее руководство, обсуждение, написание и редактирование статьи. Ф.Е.Е. — сбор данных в эксперименте, обработка данных, написание и редактирование статьи. Ш.С.Н. — сбор данных в эксперименте, обработка данных, написание статьи. Ф.Т.А. — сбор и обработка данных, написание статьи. Н.Н.С.—планирование морфологического исследования мозга животных, описание полученных результатов. Д.А.С. — сбор и обработка морфологических данных. И.А.М. — идея, обоснование порядка экспериментов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают сердечную признательность Жарковой Марии Сергеевне к. б. н., с. н. с. отдела патофизиологии Института экспериментальной медицины за помощь в обсуждении результатов и оформлении статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McAllister TW* (2011) Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialog Clin Neurosci* 13(3): 287–300.
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2011.13.2/tmcallister>
2. *Helmy EA, Todd BP, Mahoney J, Pieper AA, Ferguson PJ, Bassuk AG* (2018) Combined Blockade of Interleukin-1 α and -1 β Signaling Protects Mice from Cognitive Dysfunction after Traumatic Brain Injury. *eNeuro* 5(2): ENEURO.0385-17.2018.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0385-17.2018>
3. *Liu X, Yamashita T, Chen Q, Belevych N, Mckim DB, Tarr AJ, Coppola V, Nath N, Nemeth DP, Syed ZW, Sheridan JF, Godbout JP, Zuo J, Quan N* (2015) Interleukin 1 type 1 receptor restore: a genetic mouse model for studying interleukin 1 receptor-mediated effects in specific cell types. *Interleukin 1 type 1 receptor restore: a genetic mouse model for studying interleukin 1 receptor-mediated effects in specific cell types. J Neurosci* 35: 2860–2870.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3199-14.2015>
4. *Thome JG, Reeder EL, Collins SM, Gopalan P, Robson MJ* (2020) Contributions of Interleukin-1 Receptor Signaling in Traumatic Brain Injury. *Front Behav Neurosci* 13: 287.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00287>
5. *Шекина ЕГ, Ищенко АМ, Штрыголь СЮ, Дрогозов СМ, Симбирцев АС* (2013) Изучение церебропротекторных свойств рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина 1 человека (IL-1Ra) в эксперименте I. Влияние IL-1Ra на кровоснабжение головного мозга, нарушения кислотно-щелочного баланса, деструкцию нейронов и содержание интерлейкина 1 при экспериментальной церебральной ишемии у крыс. Цитокины и воспаление 12(1–2): 45–51. [*Shchekina EG, Ishchenko AM, Shtrygol SY, Drogovoz SM, Simbirtsev AS* (2013) Study of the cerebroprotective properties of a recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) in experiment I. Effect of IL-1Ra on cerebral blood supply, acid-base balance disorders, neuronal destruction and interleukin 1 content in experimental cerebral ischemia in rats. *Cytokines and Inflammation* 12(1–2): 45–51. (In Russ)].
6. *Шекина ЕГ, Ищенко АМ, Штрыголь СЮ, Дрогозов СМ, Симбирцев АС* (2013) Изучение церебропротекторных свойств рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина 1 человека (IL-1Ra) в эксперименте II. Церебропротекторные свойства IL-1Ra при ишемическом и травматическом поражении головного мозга у мышей Цитокины и воспаление. 12(3): 29–34. [*Shchekina EG, Ishchenko AM, Shtrygol SY, Drogovoz SM, Simbirtsev AS* (2013) Study of the cerebroprotective properties of the recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) in experiment II. Cerebroprotective properties of IL-1Ra in ischemic and traumatic brain injury in mice. *Cytokines and Inflammation* 12(3): 29–34. (In Russ)].
7. *Pradillo JM, Murray KN, Coutts GA, Moraga A, Oroz-Gonjar F, Boutin H, Moro MA, Lizasoain I, Rothwell NJ, Allan SM* (2017) Reparative effects of interleukin-1 receptor antagonist in young and aged/co-morbid rodents after cerebral ischemia. *Brain Behav Immun* 61: 117–126.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.013>
8. *Smith CJ, Hulme S, Vail A, Heal C, Parry-Jones AR, Scarth S, Hopkins K, Hoadley M, Allan SM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ* (2018) SCIL-STROKE (Subcutaneous interleukin-1 receptor antagonist in ischemic stroke) A randomized controlled phase 2 trial. *Stroke* 49: 1210–1216.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.020750>
9. *Sun M, Brady RD, Wright DK, Kim HA, Zhang SR, Sobey CG, Johnstone MR, O'Brien TJ, Semple BD, McDonald SJ, Shultz SR* (2017) Treatment with an interleukin-1 receptor antagonist mitigates neuroinflammation and brain damage after polytrauma. *Brain Behav Immun* 66: 359–371.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.08.005>

10. *Helmy A, Guilfoyle MR, Carpenter KL, Pickard JD, Menon DK, Hutchinson PJ* (2014) Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in severe traumatic brain injury: a phase II randomized control trial. *J Cereb Blood Flow Metab* 34: 845–851. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.23>
11. *Helmy A, Guilfoyle MR, Carpenter KLH, Pickard JD, Menon DK, Hutchinson PJ* (2016) Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist promotes M1 microglia biased cytokines and chemokines following human traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 36: 1434–1448. <https://doi.org/10.1177/0271678X15620204>
12. *Bergold PJ* (2016) Treatment of traumatic brain injury with anti-inflammatory drugs. *Exp Neurol* 275(3): 367–380. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.05.024>
13. *Шанин СН, Фомичева ЕЕ, Филатенкова ТА, Серебряная НБ* (2018) Коррекция нарушений нейроиммунных взаимодействий при экспериментальной черепно-мозговой травме препаратом рекомбинантного интерлейкина-2. *Мед иммунол* 20 (2): 171–178. [*Shanin SN, Fomicheva EE, Filatenkova TA, Serebryanaya NB* (2018) Correction of disorders of neuroimmune interactions in experimental traumatic brain injury with recombinant interleukin-2. *Med Immunol* 20(2): 171–178. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-2-171-178>
14. *Буреш Я, Бурешова О, Хьюстон ДП* (1991) Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. Перевод с англ Ред АС Батуев. [*Buresh Ya, Bureshova O, Houston DP* (1991) Methods and basic experiments to study the brain and behavior. Transl from English Ed AS Batuev. (In Russ)].
15. *Swanson LW* (2004) Brain maps: Structure of the rat brain. A laboratory guide with printed and electronic templates for data, models and schematics (3rd ed). Amsterdam. Elsevier.
16. *Graeber MB* (2010) Changing face of microglia. *Science* 330(6005): 783–788. <https://doi.org/10.1126/science.119092921051630>
17. *Alekseeva OS, Kirik OV, Gilerovich EG, Korzhevsky DE* (2019) Brain microglia: origin, structure and functions. *J Evol Biochem Physiol* 559(4): 231–241. <https://doi.org/10.1134/S0044452919040028>
18. *Фомичева ЕЕ, Шанин СН, Филатенкова ТА, Серебряная НБ* (2020) IL-2 как регулятор уровня стресс-гормонов и нейротропного фактора BDNF при экспериментальной черепно-мозговой травме. *Мед иммунол* 22 (4): 647–656. [*Fomicheva EE, Shanin SN, Filatenkova TA, Serebryanaya NB* (2020) IL-2 as a regulator of stress hormones and BDNF in experimental traumatic brain injury *Med Immunol* 22 (4): 647–656. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IAR-1973>
19. *Муралева НА* (2019) Влияние хронического стресса на массу тела и иммунных органов экспериментальных животных раннего возраста. *Волгоградск научно-мед журн* 64 (4):3. [*Muraeva NA* (2019) Effect of chronic stress on body weight and immune organs of experimental animals of early age. *Volgograd Scient Med J* 64(4): 3. (In Russ)].
20. *Dunn AJ* (2000) Effects of the IL-1 receptor antagonist on the IL-1- and endotoxin-induced activation of the HPA axis and cerebral biogenic amines in mice. *Neuroimmunomodulation* 7(1): 36–45. <https://doi.org/10.1159/000026418>
21. *Barfai T, Sanchez-Alavez M, Andell-Jonsson S, Schultzberg M, Vezzani A, Danielsson E, Conti B* (2007) Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever, and neurotrauma. *Ann N Y Acad Sci* 1113: 173–177. <https://doi.org/10.1196/annals.1391.022>
22. *Gadek-Michalska A, Tadeusz J, Rachwalska P, Szyrka J, Bugajski J* (2011) Effect of prior stress on interleukin-1 β and HPA axis responses to acute stress. *Pharmacol Rep* 63(6): 1393–1403. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(11\)70703-4](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(11)70703-4)
23. *Johnson JD, O'Connor KA, Watkins LR, Maier SF* (2004) The role of IL-1 β in stress-induced sensitization of proinflammatory cytokine and corticosterone responses. *Neuroscience* 127(3): 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.05.04625>
24. *Дмитриенко ЕВ, Филатенкова ТА, Рыбакина ЕГ, Корнева ЕА* (2014) Поведенческие реакции животных после экспериментальной черепно-мозговой травмы: влияние препарата нуклеотидной природы. *Вестн Санкт-Петербургск Универ* 11(3): 180–191. [*Dmitrienko EV, Filatenkova TA, Filatenkova TA, Rybakina EG, Korneva EA* (2014) Behavioral reactions of animals after experimental traumatic brain injury: the effect of a drug of nucleotide nature. *Bull St-Petersburg Univer* 11(3): 180–191. (In Russ)]. <https://cyberleninka.ru/article/n/povedencheskie-reaktsii-zhivotnyh-posle-eksperimentalnoy-cherepno-mozgovoy-travmy-vliyanie-preparata-nukleotidnoy-prirody>
25. *Umryukhin PE, Grigorchuk OS* (2017) Behavior of Rats in an Open Field Test as a Prognostic Indicator of Corticosterone Levels Before and After Stress. *Neurosci Behav Physiol* 47(4): 456–458. <https://doi.org/10.1007/s11055-017-0421-3>

26. Greenhalgh AD, Galea J, Dénes A, Tyrrell PJ, Rothwell NJ (2010) Rapid brain penetration of interleukin-1 receptor antagonist in rat cerebral ischaemia: pharmacokinetics, distribution, protection. *Br J Pharmacol* 160(1): 153–159.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00684.x>
27. McCann SK, Cramond F, Macleod MR, Sena ES (2016) Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Interleukin-1 Receptor Antagonist in Animal Models of Stroke: An Update. *Transl Stroke Res* 7(5): 395–406.
<https://doi.org/10.1007/s12975-016-0489-z>
28. Lassarén P, Lindblad C, Frostell A, Carpenter KLH, Guilfoyle MR, Hutchinson PJA, Helmy A, Thelin EP (2021) Systemic inflammation alters the neuroinflammatory response: a prospective clinical trial in traumatic brain injury. *J Neuroinflam* 18(1): 221.
<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02264-2>
29. Sjöström EO, Culot M, Leickt L, Åstrand M, Nordling E, Gosselet F, Kaiser C (2021) Transport study of interleukin-1 inhibitors using a human in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Behav Immun Health* 16: 100307.
<https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100307>
30. Zhu L, Liu X, Nemeth DP, DiSabato DJ, Witcher KG, Mckim DB, Oliver B, Le X, Gorantla G, Berdysz O, Li J, Ramani AD, Chen Z, Wu D, Godbout JP, Quan N (2019) Interleukin-1 causes CNS inflammatory cytokine expression via endothelia-microglia bi-cellular signaling. *Brain Behav Immun* 81: 292–304.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.026>
31. Shimada A, Hasegawa-Ishii S (2021) Increased cytokine expression in the choroid plexus stroma and epithelium in response to endotoxin-induced systemic inflammation in mice. *Toxicol Rev* 8: 520–528.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.002>
32. Kumar A, Loane DJ (2012) Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun* 26: 1191–1217.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.008>
33. Патлай НИ, Сотников ЕБ, Тучина ОП (2020) Роль микроглиальных цитокинов в модуляции нейрогенеза во взрослом мозге. *Международ журн прикладн и фундамент исследований* 5: 15–23 [Parlay NI, Sotnikov EB, Tuchina OP (2020) The role of microglial cytokines in the modulation of neurogenesis in the adult brain. *J Int Appl and Basic Res* 5: 15–23. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17513/mjpf.13062>
34. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y (2001) Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* 32(5): 1208–1215.
<https://doi.org/10.1161/01.str.32.5.1208>
35. Серебряная НБ, Фомичева ЕЕ, Якусени ПП (2021) Пуринергическая регуляция нейровоспаления при черепно-мозговой травме. *Успехи физиол наук* 52 (3): 24–40 [Serebryanaya NB, Fomicheva EE, Yakuseni PP (2021) Purinergic regulation of neuroinflammation in traumatic brain injury. *Advanc Physiol Sci* 52(3): 24–40. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179821030073>

Correction of Behavioral Disorders and State of Microglia with a Recombinant IL-1 Receptor Antagonist in Experimental Traumatic Brain Injury

E. E. Fomicheva^a, S. N. Shanin^a, T. A. Filatenkova^a, N. S. Novikova^a, A. S. Dyatlova^a, A. M. Ishchenko^b, and N. B. Serebryanaya^{a,*}

^a*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

^b*Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: serebr@gmail.com

TBI is a multifactorial disease that can lead to the development of neurological diseases. To correct violations of physiological functions, anti-inflammatory cytokines are used, in particular, the IL-1 receptor antagonist (IL-1RA). The aim of the work is to evaluate the effectiveness of the rIL-1RA preparation for the correction of post-traumatic neuroinflammation. TBI in rats was modeled when a weight of 115 g fell from a height of 120 cm into the center of the parietal region; the drug at a dose of 50 mg/kg was administered subcutaneously 60 minutes after the injury. We studied the levels of corticosterone in the blood, behavioral responses in the “Open field” test. To characterize the activation pattern of microglia in different parts of the brain, the expression of the Iba1 marker and

morphological changes in cells were used. Counting the number and changing the shape and size of Iba1-positive microglial cells on day 7 after TBI showed that in animals treated with rIL-1RA, the number of activated microglial cells was significantly higher than in control animals, but the degree of their activation was significantly lower. Studies of CNS function disorders after TBI showed that motor and orienting-exploratory activities were significantly inhibited, which, together with a violation of the emotional status of animals, indicates the development of a neurological deficit in control rats. In animals treated with rIL-1RA, changes in behavioral characteristics were less pronounced. The decrease in neurological deficit in treated animals was directly related to the normalization of the state of microglia. The data obtained in the work indicate that the use of rIL-1RA 1 hour after TBI makes it possible to correct motor, orienting-exploratory activity and reduce microglia activation in various parts of the CNS.

Keywords: TBI, corticosterone, rIL-1RA, behavior, microglia

**ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕГУЛЯТОРА СТРЕССА
ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА ХВР1
В КИШЕЧНО-АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ У КРЫС
ЛИНИИ ВИСТАР В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА**

© 2022 г. И. А. Топол¹, *, И. С. Полякова¹, А. В. Елыкова¹, А. М. Камышный²

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия

²Тернопольский государственный медицинский университет, Тернополь, Украина

*E-mail: innatopol08@gmail.com

Поступила в редакцию 19.03.2022 г.

После доработки 31.07.2022 г.

Принята к публикации 02.08.2022 г.

Хронический социальный стресс способен вызывать физиологические нарушения, провоцируя развитие депрессии и тревоги, а стресс-индуцированная иммунная дисрегуляция является триггером развития многих патологических состояний, включая воспалительные заболевания кишечника. Новые данные на экспериментальных моделях животных предполагают определенную связь между стрессом эндоплазматического ретикулума, депрессией и развитием воспалительного процесса. В условиях клеточного стресса количество белков с нарушенным фолдингом растет, что приводит к развитию стресса эндоплазматического ретикулума. Стресс эндоплазматического ретикулума, в свою очередь, активирует систему “ответа на несвернутые белки” (unfolded protein response, UPR), среди которых чрезвычайно важное значение имеет сигнальная система IRE1–ХВР1. Транскрипционный фактор ХВР1 является ответственным за регуляцию экспрессии большого количества генов, причастных к правильному свертыванию и созреванию белков, деградации неправильно свернутых белков, регуляции иммунных реакций, а изменения его экспрессии могут существенно влиять на риск развития заболевания и прогрессировании воспалительных и аутоиммунных заболеваний, включая воспалительные заболевания кишечника.

Ключевые слова: стресс эндоплазматического ретикулума, X-бокс-связывающий белок 1, хронический стресс, кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань

DOI: 10.31857/S0869813922100119

Ситуация, сложившаяся в последние годы в современном обществе, характеризуется высоким уровнем социального напряжения, при котором стрессы приобретают затяжной характер. Активация реакции на стресс приводит к изменениям, связанным с возможностью организма скорректировать свой гомеостаз и таким образом минимизировать потенциальное воздействие угрозы. Однако хронический социальный стресс способен вызывать физиологические нарушения не только в нейроэндокринной системе, провоцируя развитие депрессии и тревоги, но и приводить к изменениям функционирования врожденного и адаптивного иммунитета, а стресс-индуцированная иммунная дисрегуляция является триггером разви-

тия многих патологических состояний, включая воспалительные заболевания кишечника [1].

Как известно, даже в нормальных физиологических условиях до 30% белков, синтезируемых на рибосомах, имеют нарушенную третичную и четвертичную структуру (так называемые “дефектные рибосомальные продукты”) [2–4]. В условиях клеточного стресса количество таких белков с нарушенным фолдингом растет еще больше, что приводит к развитию стресса эндоплазматического ретикулума (СЭР) и функциональной перегрузке системы молекулярных шаперонов и убиквитин-протеасомной системы [2, 5]. Это, в свою очередь, нарушает уровень презентации эндогенных пептидов антиген-представляющим клеткам и может приводить к развитию аутофагии, апоптоза или воспаления [6, 7]. Как противодействие развитию СЭР в клетках активируется система “ответа на несвернутые белки” (unfolded protein response, UPR), которая необходима для сохранения ее функциональной целостности [3–5]. Этот процесс носит защитный, приспособительный характер, позволяя клеткам нивелировать нарушения, связанные со СЭР. Однако если синтез, фолдинг, транспорт и деградация белков не нормализуются, в клетке развивается апоптоз из-за прямой активации протеаз (специфичной для эндоплазматического ретикулума каспазы 12), ряда протеинкиназ (Ask, JNK, p38 MAPK) и транскрипционных факторов (ATF4, ATF6) [6–9].

Среди трех канонических путей, регулирующих развитие СЭР, чрезвычайно важное значение имеет сигнальная система IRE1–XBP1. При стрессе ЭПР происходит активация трансмембранной киназы/эндорибонуклеазы IRE1, которая специфически распознает 5' и 3' сайты сплайсинга мРНК XBP1 и вырезает 2-й нуклеотидный интрон – короткую последовательность длиной 26 пН [2, 10]. Это приводит к сдвигу рамки считывания и трансляции активного транскрипционного фактора XBP1 длиной в 376 аминокислот. Образование и накопление сплайсинговой формы мРНК гена *XBP1* является характерным маркером активации сигнального пути IRE1–XBP1 системы UPR, координирующей метаболические и иммунные реакции [11–14]. Именно этот альтернативный сплайс-вариант транскрипционного фактора XBP1 отвечает за регуляцию экспрессии сотен генов, причастных к правильному свертыванию и созреванию белков, в том числе к деградации неправильно свернутых белков [10].

Как известно, транскрипционный фактор XBP1 (X box-binding protein 1) был первоначально выявлен как критический фактор в регуляции экспрессии генов главного комплекса гистосовместимости (МНС, от англ. major histocompatibility complex) II класса у человека в начале 90-х годов. Позднее в ряде исследований на экспериментальных моделях грызунов была показана ключевая роль XBP1 в регуляции иммунных реакций, в частности продукции провоспалительных цитокинов. А изменение уровня транскрипционной активности XBP1 оказывало существенное влияние на риск развития воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в том числе воспалительных заболеваний кишечника, так как снижение его экспрессии блокировало продукцию антимикробных пептидов клетками Панета, вызывало развитие СЭР, гиперактивацию IRE1 и в дальнейшем могло приводить к активации генов провоспалительных цитокинов, развитию хронического воспаления и клеточной смерти (в первую очередь аутофагии) [4, 6, 7, 10].

Представляют интерес данные о наличии функциональной связи между СЭР и хроническим социальным стрессом, в частности, в ряде работ показана взаимосвязь системы “ответа на несвернутые белки” с развитием стресс-индуцированной депрессии и когнитивных нарушений у крыс [15–17], а изменения уровня экспрессии ключевых регуляторов PERK, IRE1a и ATF6a индуцировали развитие апоптоза в условиях хронического социального стресса [18, 19]. Это, в свою очередь, дает возможность предположить участия стресса ЭПР в развитии и прогрессировании

воспалительных и аутоиммунных заболеваний в условиях хронического социального стресса.

Учитывая литературные данные, нами было допущено, что одним из возможных механизмов изменения функционального состояния иммунных структур, ассоциированных со слизистыми оболочками желудочно-кишечного тракта в условиях ХСС являлось снижение экспрессии транскрипционного фактора ХВР1, и как следствие, нарушение дифференциации и выживания дендритных клеток, В- и Т-лимфоцитов с последующей активацией продукции провоспалительных цитокинов иммунными клетками.

В связи с этим, целью настоящей работы было изучение уровня экспрессии мРНК ХВР1, провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-17 α в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани у крыс линии Вистар в экспериментальных моделях хронического социального стресса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на 60 половозрелых самках крыс линии Вистар. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами Украины, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике Института физиологии НАН Украины (от 21.02.2006 № 3447-IV). Животные случайным образом были разделены на 3 экспериментальные группы по 20 крыс: контрольные крысы (группа 1), которые содержались в стандартных условиях, со свободным доступом к воде и пище, такие параметры содержания, как температура и влажность, поддерживались постоянными на протяжении всего эксперимента. Крысы, которым моделировали хронический социальный стресс ХСС1 путем трехнедельной социальной изоляции и длительного психоэмоционального воздействия, содержались в условиях перманентного проживания самок в “агрессивной среде”, а именно, через перфорированную перегородку в клетке с агрессивным самцом, ежедневно вступающим в конфронтации с подсаженным к нему другим самцом (группа 2). Группу 3 составляли крысы, которым моделировали ХСС2 путем содержания животных в перенаселенных клетках с ежедневной сменой группировки, при этом подопытную самку каждый день помещали в новую сбалансированную и перенаселенную колонию.

Для получения доказательства того, что у крыс действительно развился социальный стресс, выраженный проявлением тревожности и депрессивного состояния, были проведены характерные поведенческие тесты. Уровень эмоционально-поведенческой и исследовательской активности изучали в тестах “открытое поле” и “перегородка”, где эти параметры оценивались по числу фекальных болюсов, подъемах на задние лапки, обнюхивании, замирании (фризинг), времени и числу груммингов, поиске убежища [20]. В тесте Порсолта (“принудительное плавание”) по времени пассивного плавания и проявлению первой иммобильности определяли уровень депрессивности животных [21].

Объектом для молекулярно-генетических исследований методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР Real-time) были сгруппированные лимфоидные узелки подвздошной кишки (пейеровы бляшки), которые помещали в фиксатор Буэна, проводили дегидратацию в восходящих концентрациях этанола и парафинировали.

Выделение тотальной РНК, полученной из гистологических срезов толщиной 15 мкм путем предварительной депарафинизации в ксилоле с последующей регидратацией в нисходящих концентрациях этанола (100, 96, 70%) и гомогенизацией с помощью ступки и пестика, проводили с использованием набора “Trizol RNA Prep

Таблица 1. Праймеры, используемые для анализа экспрессии мРНК исследованных и референсного генов

Ген	GenBank accession	Праймер
<i>XBP1</i>	NC_051349.1	F = 5'-ACACGCTTGGGAATGGACAC-3' R = 5'-CCATGGGAAGATGTTCTGGG-3'
<i>И17a</i>	NC_051344.1	F = 5'CTGGACTCTGAGCCGCAATG-3' R = 5'TGCCTCCCAGATCACAGAAG-3'
<i>И1b</i>	NC_051338.1	F = 5'TCTTTGAAGAAGAGCCCGTCC-3' R = 5'GGTCGTCATCATCCCACGAG-3'
<i>GAPDH</i>	NC_051339.1	F = 5'GCCTGGAGAAACCTGCCAAG-3' R = 5'GCCTGCTTACCACCTTCT-3'

F – прямой праймер; R – обратный праймер.

100” (Изоген Lab., LTD, Россия), который содержал Trizol reagent (лизирующий реагент, в состав которого входил денатурирующий агент гуанидинтиоционат и фенол, рН 4.0) и ExtraGeneE (суспензия смеси ионообменников). Подготовку и проведение реакции проводили соответственно протоколу набора.

Концентрацию и качество выделенной тотальной РНК определяли на спектрофотометре LibraS32PC (Biochrom Ltd., Англия). Для последующей процедуры обратной транскрипции (ОТ) отбирали образцы РНК со следующими показателями (по соотношению оптической плотности A260/A280): 260 нм/280 нм = 1.8–2.2.

Для проведения ОТ и получения кДНК использовали 2 мкл РНК и набор ОТ-1 фирмы “Синтол” (Россия). Для определения уровня экспрессии исследуемых генов использовали амплификатор CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США) и набор реактивов Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (Thermo Scientific, США). Согласно инструкции производителя, финальная реакционная смесь для амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК-полимеразу Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0.3 мМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл добавлением деионизированной H₂O. Специфические пары праймеров (5'–3') для анализа исследуемых и референсного генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) и изготовлены фирмой Metabion (Германия) (табл. 1). Амплификация происходила при следующих условиях: иницированная денатурация 95°C – 10 мин; далее 50 циклов: денатурация – 95°C, 15 с, отжиг праймеров – 58–63°C, 30 с, элонгация – 72°C, 30 с. Регистрация интенсивности флуоресценции происходила автоматически в конце стадии элонгации каждого цикла по каналу автоматически SybrGreen. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследуемых генов был использован ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH). Относительное нормализованное количество кДНК целевых генов определяли методом ΔΔCt. Данные нормировали по среднему значению контрольной группы и логарифмировали по основанию 2, чтобы привести к нормальному распределению. В эксперимент были включены отрицательные контроли: без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы в синтезе кДНК, без добавления фермента в синтезе кДНК. Все реакции амплификации выполняли на индивидуальных образцах в трех повторах. Всего в этом опыте использовано по 10 самок крыс каждой экспериментальной группы.

Статистический анализ данных ПЦР проводили с помощью программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США). С целью проверки гипотезы о харак-

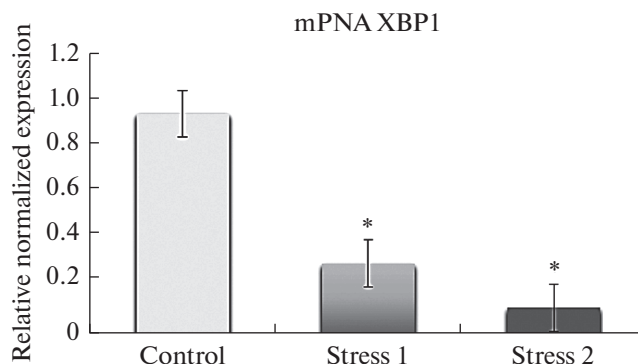


Рис. 1. Относительное нормализованное количество мРНК гена *XBP1*. Нормализация по методу $\Delta\Delta Ct$ с референсным геном *GAPDH*.

control – контроль; stress 1 – ХСС1; stress 2 – ХСС2.

* – наличие достоверных различий между показателями контрольных и опытных групп, $p < 0.05$.

тере распределения исследуемых данных применяли тест Колмогорова–Смирнова. При подтверждении гипотезы о нормальном распределении использовали параметрический непарный *t*-критерий, при отклонении гипотезы – непараметрический непарный *U*-критерий Манна–Уитни. Значимость полученных результатов оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, в качестве апостериорного критерия применяли критерий Даннета. Критичный уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что изменения экспрессии *XBP1* могут существенно влиять на уровень продукции провоспалительных цитокинов и в дальнейшем приводить к развитию воспалительных и аутоиммунных заболеваний. В связи с этим в нашей работе была проанализирована транскрипционная активность генов *XBP1*/про-воспалительных цитокинов *IL-1 β* , *IL-17 α* в кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани.

Согласно нашим данным, уровень экспрессии мРНК *XBP1* в клетках демонстрировал динамику к снижению. Так, в экспериментальных моделях этот показатель уменьшился при ХСС1 в 3.1 раза ($p < 0.05$), а на фоне ХСС2 – в 8 раз ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой крыс (рис. 1).

Развитие хронического социального стресса также сопровождалось существенными изменениями в экспрессии генов *IL-1 β* и *IL-17 α* в кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани крыс, более выраженной в случае ХСС1. В частности, проведенное исследование установило однонаправленную динамику роста транскрипционной активности *IL-1 β* (в 6 раз ($p < 0.05$) при ХСС1 и в 2.8 раз ($p < 0.05$) при ХСС2); *IL-17 α* (в 2.3 раза ($p < 0.05$) при ХСС1 и на 53% ($p < 0.05$) при ХСС2) по сравнению с контрольной группой животных (рис. 2–3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно литературным данным, *XBP1* является одним из ключевых факторов транскрипции, индуцирующих ответ на несвернутые белки, и мощным регулятором работы генов провоспалительных цитокинов. Поэтому изменения его экс-

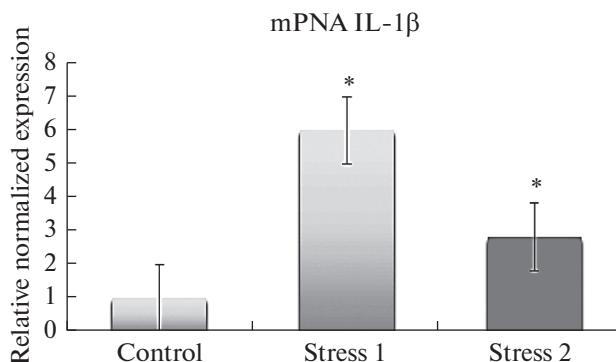


Рис. 2. Относительное нормализованное количество мРНК гена *IL-1β* в клетках кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани. Нормализация по методу $\Delta\Delta$ Ct с референсным геном *GAPDH*. control – контроль; stress 1 – ХСС1; stress 2 – ХСС2.

* – наличие достоверных различий между показателями контрольных и опытных групп, $p < 0.05$.

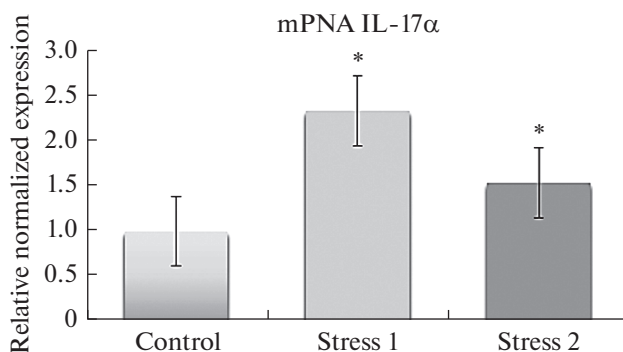


Рис. 3. Относительное нормализованное количество мРНК гена *IL-17α* в клетках кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани. Нормализация по методу $\Delta\Delta$ Ct с референсным геном *GAPDH*.

Примечание: control – контроль; stress 1 – ХСС1; stress 2 – ХСС2.

* – наличие достоверных различий между показателями контрольных и опытных групп, $p < 0.05$.

прессии в условиях действия стрессовых факторов различной природы, в том числе хронического социального стресса, по мнению ряда авторов, могут существенно влиять на уровень продукции провоспалительных цитокинов (*IL-1β*, *IL-6*, *IL-17α* и *TNF-α*) и в дальнейшем приводить к развитию воспалительных и аутоиммунных заболеваний [22–27]. В настоящем исследовании мы установили, что во всех группах животных на фоне экспериментальных моделей ХСС1 и ХСС2 наблюдалось достоверное снижение уровня экспрессии мРНК *XBP1*. Это, в свою очередь, сопровождалось активацией продукции *IL-17α* и *IL-1β* иммунными клетками. Возможно, дефицит *XBP1*, вызванный, согласно нашему исследованию, социальным стрессом, являлся одним из тех механизмов, который приводил к развитию СЭР и, как следствие, способствовал повышенной транскрипционной активности генов *IL-1β* и *IL-17α*. И данный факт подтверждался в ряде работ [6, 18, 24, 26–28]. Так, в исследовании Lotrich было обнаружено, что повышение уровня *IL-6*, *TNF-α*, *IL-1β*

и их растворимых рецепторов опосредуется UPR у пациентов с тяжелой депрессией [28]. А работы Liu с соавт. и Zhang с соавт. на животных продемонстрировали взаимосвязь между изменением экспрессии *XBP1* и развитием воспалительных процессов при хроническом социальном стрессе [15, 29].

Кроме того, недавно было выявлено наличие важной связи между внутриклеточным стрессом ЭПР и органоспецифическим воспалением в кишечнике [6, 30, 31]. В частности, исследования показали, что делеция *XBP1* в эпителиальных клетках мышей приводила к спонтанному развитию воспаления в тонком кишечнике, включая формирование абсцессов крипт, лейкоцитарную инфильтрацию и явные язвы. Примечательно, что даже удаление одного аллеля *XBP1* было достаточно, чтобы вызвать развитие спонтанного энтерита у большого количества животных [6, 22]. Кроме того, гипоморфный *XBP1* с потерей одного аллеля также приводил к дисфункции клеток Панета и повышенной чувствительности к DSS – индуцированному колиту у мышей, а удаление обоих аллелей приводило к апоптозу клеток Панета [22]. Более ранние исследования на людях показали аналогичные результаты. При этом стресс ЭПР может быть основной причиной воспалительного процесса в кишечнике (например, как это наблюдалось у *XBP1*^{-/-} мышей) или следствием воспаления (например, как у *IL-10*^{-/-} и *IRE1β*^{-/-} дефицитных мышей) [22], а пациенты с болезнью Крона и язвенным колитом продемонстрировали снижение уровня *XBP1* [22, 23].

Также несколько полногеномных исследований указывали на связь между воспалительными заболеваниями кишечника и областью генома физически близкого к генам *XBP1* и *IRE1β* [11, 12]. Секвенированием определены новые редкие однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в *XBP1*, которые наряду с другими экологическими и генетическими факторами риска могут давать склонность или индуцировать патологический процесс в кишечнике. Так, Kaser и соавт. обнаружили, что SNP *XBP1* rs5997391, rs5762795 и rs35873774 ассоциированы с воспалительными заболеваниями кишечника [6]. Однако несмотря на безусловную важность изменений экспрессии *XBP1* эпителиальными клетками кишечника в развитии патологии, в настоящее время в целом ряде работ была показана способность данного транскрипционного фактора регулировать реакции врожденного и адаптивного иммунитета [11, 12, 30–34]. Недавно было показано, что сигнализация через TLR активирует путь *IRE1/XBP1*, и это имеет решающее значение для иммунной защиты организма [12, 14, 34]. Как было отмечено, TLR – высококонсервативные рецепторы, распознающие патоген-ассоциированные молекулярные паттерны и сигналы опасности. При стимуляции *in vitro* макрофагов агонистами TLR2 (Pam3CSK4) и TLR4 (LPS) активируется *IRE1/XBP1*-путь независимо от других механизмов системы “ответа на несвернутые белки” и в отсутствие стресса ЭПР [12]. Интересно, что обработка активированных макрофагов липополисахаридом вместе с туникамицином (tunicamycin) вызывала ингибирование туникамицин-индуцированного стресса ЭПР. В дальнейшем исследовании авторы наблюдали TLR-опосредованный путь активации *XBP1*. В свою очередь, *XBP1* способствовал выработке провоспалительных цитокинов, включая *IL-6*, *TNF* и *IFN-β* [12]. Таким образом, дефицит *XBP1* увеличивал бактериальную инфекцию у мышей за счет снижения уровня этих цитокинов. Было обнаружено, что транскрипционный фактор *XBP1* взаимодействовал с промоторными областями генов *IL-6* и *TNF*, что вызвало устойчивую продукцию провоспалительных цитокинов (*IL-6* и *TNF-α*) [12]. Поэтому можно считать, что *XBP1* играет важную физиологическую, в том числе и защитную роль как во врожденном, так и в адаптивном иммунитете. Это неудивительно, учитывая, что *IRE1* имеет α и β домены РНКазы, являющиеся уникальными гомологами подобным доменам RNase L, важной составляющей противовирусной системы [35, 36].

Как известно, дендритные клетки играют решающую роль в распознавании патогенов и в инициации врожденных и адаптивных иммунных реакций. Несколько исследований показали высокий уровень экспрессии ХВР1s в дендритных клетках по сравнению с инактивированными Т- и В-лимфоцитами. IRE1 α -ХВР1 сигнальный путь системы “ответа на несвернутые белки” также имеет важное значение для развития и выживания дендритных клеток, в том числе и плазматических дендритных клеток (pDCs) [22, 37, 38]. Так, у ХВР1-дефицитных мышей наблюдалось снижение количества этих клеток, особенно плазматических и соответственно уменьшение уровня секреции IFN- α . Также снижение экспрессии или отсутствие ХВР1 нарушало дифференциацию и выживание дендритных клеток, а повышенная экспрессия транскрипционного фактора усиливала их развитие [22, 30].

Кроме этого, выявленные нами изменения экспрессии ХВР1 при стрессе могут оказать значительное влияние и на процессы дифференцировки клеток адаптивной иммунной системы. Доказано, что ХВР1 индуцирует дифференцировку активированных В-лимфоцитов в плазматические клетки [27, 30, 38]. Было продемонстрировано, что ХВР1-дефицитные В-клетки показали нормальную пролиферацию и активацию, однако при этом был снижен уровень экспрессии J-цепи, необходимой для сборки Ig [3, 30]. Поэтому эти животные были более восприимчивы к инфекциям, а восстановление экспрессии ХВР1 приводило к возобновлению производства Ig. Известно, что индуцированная ХВР1 экспрессия IL-6 в В-клетках селезенки является фактором их терминальной дифференцировки [3, 38]. Таким образом, экспрессия ХВР1 в профессиональных секреторных клетках, возможно, способствует развитию дополнительных функций, позволяющих этим клеткам реагировать на физиологические сигналы системы “ответа на несвернутые белки”. Механизм активации системы “ответа на несвернутые белки” и ХВР1 при дифференцировке плазматических клеток до сих пор остается интересным и открытым вопросом. А учитывая ту важность, которую играют В-клетки в защите слизистой кишечника от патогенов, становятся понятны возможные последствия выявленных нами изменений экспрессии ХВР1 лимфоцитами кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани. Кроме того, данные изменения могут влиять и на конечную продукцию плазматическими аутоантител к клеточным антигенам, что объясняет резкое увеличение частоты аутоиммунных заболеваний у людей, подвергавшихся действию социального стресса. Также известно, что реакция на стресс ЭПР – это критический фактор инициации дифференцировки Т-клеток при распознавании антигена [39–42].

Таким образом, полученные результаты раскрывают роль стресса ЭПР в развитии воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в том числе и в воспалительных заболеваниях кишечника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование показало, что события, происходящие в кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани в условиях хронического социального стресса, явно противоречат классической парадигме стресса и провоцируют не иммуносупрессию, а выраженную активацию иммунной системы с последующим развитием воспалительного процесса. На наш взгляд, одним из возможных механизмов такого физиологического изменения в структурах, ассоциированных со слизистой оболочкой желудочно-кишечного тракта являлось снижение экспрессии транскрипционного фактора ХВР1, и как следствие, последующая активация продукции провоспалительных цитокинов иммунными клетками. Полученные нами данные продемонстрировали достоверное уменьшение уровня экспрессии мРНК

XBP1. Это, в свою очередь, приводило к увеличению продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и IL-17 α .

Таким образом, результаты эксперимента дают возможность предположить участия стресса эндоплазматического ретикулума в развитии и прогрессировании воспалительных заболеваний кишечника в условиях хронического социального стресса.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках НИР “Роль нарушений взаимоотношений лимфоидного и эпителиального компартментов иммунной системы слизистых оболочек в развитии экспериментальной патологии” (НИР № 0108U005113).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента (А.М.К.), сбор данных (И.А.Т., И.С., П. А.В.Е.), обработка данных (И.А.Т., И.С.П., А.В.Е.), написание и редактирование манускрипта (И.А.Т., А.М.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dhabhar F* (2014) Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res* 58(2–3): 193–210.
<https://doi.org/10.1007/s12026-014-8517-0.210>
2. *Almanza A, Carlesso A, Chintha C, Creedican S, Doultisinos D, Leuzzi B, Luis A, McCarthy N, Montibeller L, More S, Papaioannou A, Püschel F, Sassano ML, Skoko J, Agostinis P, Jackie de Belleruche, Eriksson LA, Fulda S, Gorman AM, Healy S, Kozlov A, Muñoz-Pinedo C, Rehm M, Chevet E* (2019) Endoplasmic reticulum stress signalling—from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J* 286: 241–278.
<https://doi.org/10.1111/febs.14608>
3. *Schwarz DS, Blower MD* (2016) The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 73: 79–94.
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
4. *Дедов ИИ, Смирнова ОМ, Горелышев АС* (2012) Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека. *Пробл эндокринолог* 58(5): 57–65. [*Dedov II, Smirnova OM, Gorelyshev AS* (2012) Stress of endoplasmic reticulum: the cytological “scenario” of pathogenesis of human diseases. *Probl Endokrinol* 58(5): 57–65. (In Russ)].
5. *Зверев ЯФ, Брюханов ВМ* (2013) Стресс эндоплазматического ретикулума глазами нефролога. *Нефрология* 17(2): 39–54. [*Zverev YF, Bryuhanov VM* (2013) Endoplasmic reticulum stress in terms of nephrologist (message ii). *Nephrology (Saint-Petersburg)* 17(2): 39–54. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24884/1561-6274-2013-17-2-39-546>
6. *Kaser A, Blumberg R* (2010) Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucos Immunol* 3: 11–16.
<https://doi.org/10.1038/mi.2009.122>
7. *Kaser A, Flak M, Blumberg R* (2011) The unfolded protein response and its role in intestinal homeostasis and inflammation. *Exp Cell Res* 15: 2772–2779.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.07.008>
8. *Меситов МВ, Московцев АА, Кубатиев АА* (2013) Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулума: система UPR (Unfolded Protein Response). *Патол физиол экспер терапия* 4: 97–108. [*Mesitov MV, Moskovtsev AA, Kubatiev AA* (2013) Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of unfolded protein response *Patol Fiziol Eksp Ter* 4: 97–108. (In Russ)].
9. *Hillary RF, FitzGerald U* (2018) A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *J Biomed Sci* 25(1): 48.
<https://doi.org/10.1186/s12929-018-0453-1>

10. *Glimcher L* (2010) XBP1: the last two decades. *Ann Rheum Dis* 69: 67–71.
<https://doi.org/10.1136/ard.2009.119388>
11. *Martinon F, Glimcher L* (2011) Regulation of Innate Immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Immunol* 23: 35–40.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.10.016>
12. *Martinon F, Chen X, Glimcher L* (2010) Toll-like receptor activation of XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol* 11: 411–418.
<https://doi.org/10.1038/ni.1857>
13. *Rong Wu, Qing-Hai Zhang, Yan-Ju Lu, Kun Ren, Guang-Hui Yi* (2015) Involvement of the IRE1 α -XBP1 pathway and XBP1s-dependent transcriptional reprogramming in metabolic diseases DNA. *Cell Biol* 34(1): 6–18.
<https://doi.org/10.1089/dna.2014.2552>
14. *Kaufman R, Cao S* (2010) Inositol-requiring 1/X-box-binding protein 1 is a regulatory hub that links endoplasmic reticulum homeostasis with innate immunity and metabolism. *EMBO Mol Med* 6: 189–192.
<https://doi.org/10.1002/emmm.201000076>
15. *Zhang Y, Liu W, Zhou Y, Ma C, Li S, Cong B* (2014) Endoplasmic reticulum stress is involved in restraint stress-induced hippocampal apoptosis and cognitive impairments in rats. *Physiol Behav* 131: 41–48.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.04.014>
16. *Zhao T, Huang GB, Muna SS, Bagalkot TR, Jin Han-Jung Chae HM, Chung Y-Ch* (2013) Effects of chronic social defeat stress on behavior and choline acetyltransferase, 78-kDa glucose-regulated protein, and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein in adult mice. *Psychopharmacology* 228: 217–230.
<https://doi.org/10.1007/s00213-013-3028-6>
17. *Timberlake M, Roy Bh, Dwivedi Y* (2019) A Novel Animal Model for Studying Depression Featuring the Induction of the Unfolded Protein Response in Hippocampus. *Mol Neurobiol* 56(12): 8524–8536.
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-01687-6>
18. *Wu J, Rutkowski TD, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Junying Wang, Benbo Song, Yau Grace D-Y, Kaufman RJ* (2007) ATF6 α Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress. *Development Cell* 13(3): 351–364.
<https://doi.org/doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.005>
19. *Gao H, He C, Hua R, Guo Y, Wang B, Liang C, Gao L, Shang H, Xu JD* (2022) Endoplasmic Reticulum Stress of Gut Enterocyte and Intestinal Diseases. *Front Mol Biosci* 24(9): 817392.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.817392>
20. *Амикишиева АВ* (2009) Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование Вестник ВОГиС 13(3):529–542. [*Amikishieva AV* (2009) Behavioral phenotyping: Modern methods and equipment. *Bull VOGiS* 13(3): 529–542. (In Russ)].
21. *Porsolt RD, Pichon ML, Jalfre M* (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. *Nature* 266: 730–732.
22. *Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, Nieuwenhuis ES, Higgins DE, Schreiber S, Glimcher LH, Blumberg RS* (2008) XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134(5): 743–756.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.021>
23. *Ma X, Dai Z, Sun K, Zhang Y, Chen J, Yang Y, Tso P, Wu G, Wu Z* (2017) Intestinal Epithelial Cell Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis: An Update Review. *Front Immunol* 8: 1271.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30038-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30038-8)
24. *Reverendo M, Mendes A, Argüello RJ, Gatti E, Pierre P* (2019) At the crossway of ER-stress and pro-inflammatory responses. *The FEBS J* 286(2): 297–310.
<https://doi.org/10.1111/febs.14391>
25. *Giraud-Billoud M, Fader CM, Aguero R, Ezquer F, Ezquer M* (2018) Diabetic nephropathy, autophagy and proximal tubule protein endocytic transport: a potentially harmful relationship. *Biocell* 42(2): 35–40.
<https://doi.org/10.32604/biocell.2018.07010>
26. *Hooper KM, Barlow PG, Henderson P, Stevens C* (2019) Interactions between autophagy and the unfolded protein response: implications for inflammatory bowel disease. *Inflam Bowel Dis* 25(4): 661–671.
<https://doi.org/10.1093/ibd/izy>
27. *Coleman OI, Haller D* (2019) ER Stress and the UPR in Shaping Intestinal Tissue Homeostasis and Immunity. *Front Immunol* 10: 2825.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02825>

28. *Lotrich F* (2012) Inflammatory Cytokines, Growth Factors, and Depression. *Curr Pharm Des* 18: 5920–5935.
<https://doi.org/10.2174/138161212803523680>
29. *Liu L, Zhao Z, Lu L, Liu JL, Sun J, Wu X, Dong J* (2019) Icaritin and icaritin ameliorated hippocampus neuroinflammation via inhibiting HMGB1-related pro-inflammatory signals in lipopolysaccharide-induced inflammation model in C57BL/6J mice. *Int Immunopharmacol* 68: 95–105.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.055>
30. *So J-S* (2018) Roles of endoplasmic reticulum stress in immune responses. *Mol Cells* 41: 705–716.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0241>
31. *Cao SS, Luo KL, Shi L* (2016) Endoplasmic reticulum stress interacts with inflammation in human disease. *J Cell Physiol* 231: 288–294.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25098>
32. *Oakes SA, Papa FR* (2015) The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 10: 173–194.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649>
33. *Wu R, Zhang Q-H, Lu Y-J, Ren K, Yi G-H* (2015) Involvement of the IRE1 α -XBP1 pathway and XBP1s-dependent transcriptional reprogramming in metabolic diseases. *DNA Cell Biol* 34: 6–18.
<https://doi.org/10.1089/dna.2014.2552>
34. *Hirayama D, Iida T, Nakase H* (2018) Phagocytic function of macrophages – providing innate immunity and tissue homeostasis. *Int J Mol Sci* 19: 92.
<https://doi.org/10.3390/ijms19010092>
35. *Park SM, Kang TI, So JS* (2021) Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes. *Biomedicines* 9(7): 791.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9070791>
36. *Kazantseva AV, Davydova YD, Enikeeva RF, Valinurov RG, Gareeva AE, Khusnutdinova NN, Khusnutdinova EK* (2021) The association study of polymorphic variants of hypothalamic-pituitary-adrenal system genes (AVPR1B, OXTR) and aggressive behavior manifestation: a focus on social environment. *Res Results Biomed* 7(3): 232–244.
<https://doi.org/10.18413/2658-6533-2021-7-3-0-3>
37. *Wang Y, Zhang Y, Yi P, Dong W, Nalin AP, Zhang J, Zhu Z, Chen L, Benson DM, Mundy-Bosse BL, Freud AG, Caligiuri MA, Jianhua Yu* (2019) The IL-15-AKT-XBP1s signaling pathway contributes to effector functions and survival in human NK cells. *Nat Immunol* 20: 10–17.
<https://doi.org/10.1038/s41590-018-0265-1>
38. *Brunsing R, Omori S, Niwa M* (2008) B- and T-cell Development Both Involve Activity of the Unfolded Protein Response Pathway. *J Biol Chem* 283: 17954–17961.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M801395200>
39. *Stadhouders R, Lubberts E, Hendriks RW* (2018) A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J Autoimmun* 87: 1–15.
40. *Saravia J, Chapman NM, Chi H* (2019) Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol* 16: 634–643.
<https://doi.org/10.1038/s41423-019-0220-6>
41. *Pramanik J, Chen X, Kar G, Henriksson J, Gomes T, Park J-E, Natarajan K, Meyer KB, Miao Z, McKenzie ANJ, Mahata B, Teichmann SA* (2018) Genome-wide analyses reveal the IRE1 α -XBP1 pathway promotes T helper cell differentiation by resolving secretory stress and accelerating proliferation. *Genome Med* 10: 76.
<https://doi.org/10.1186/s13073-018-0589-3>
42. *Walker JA, McKenzie ANJ* (2018) T_H2 cell development and function. *Nat Rev Immunol* 18: 121–133.
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.118>

Peculiarities of Endoplasmic Reticulum Stress Regulator XBP1 Expression in the Gut-Associated Lymphoid Tissue of Wistar Rats under Chronic Stress

I. A. Topol^{a, *}, I. S. Polyakova^a, A. V. Elykova^a, and A. M. Kamyshny^b

^a*Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia*

^b*Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine*

*e-mail: innatopol08@gmail.com

Chronic social stress (CSS) can cause physiological disturbances, provoking the development of depression and anxiety, and stress-induced immune dysregulation is a trigger

for the development of many pathological conditions, including inflammatory bowel diseases. New data in human and animal models suggest an intriguing relationship between endoplasmic reticulum stress, depression and inflammation. Under cellular stress, the number of protein folding disorders increases, which leads to the development of endoplasmic reticulum (ER) stress. The SER, in turn, activates the “unfolded protein response” system (unfolded protein response, UPR), the IRE1-XBP1 signaling system is very important. The transcription factor XBP1 is responsible for regulating the expression of a large number of genes involved in the proper folding and maturation of proteins, the degradation of misfolded proteins and regulation of immune responses. In addition, changes in XBP1 expression can significantly affect the risk of developing the disease and the progression of inflammatory and autoimmune diseases, including inflammatory bowel disease.

Keywords: UPR, XBP1, chronic stress, gut-associated lymphoid tissue (GALT)

ДЛИТЕЛЬНАЯ ПОСТОЯННАЯ ТЕМНОТА МОДУЛИРУЕТ ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ α -ТОКОФЕРОЛА У КРЫС

© 2022 г. И. В. Баишникова¹, *, Т. Н. Ильина¹, Е. А. Хижкин¹, В. А. Илюха¹

¹Институт биологии Карельского научного центра РАН, ФИЦ “КарНЦ РАН”,
Петрозаводск, Россия

*E-mail: iravbai@mail.ru

Поступила в редакцию 19.07.2022 г.

После доработки 22.08.2022 г.

Принята к публикации 23.08.2022 г.

Цикл света и темноты является одним из основных факторов окружающей среды, влияющих на ритмичность биологических процессов в организме. Изменение или отсутствие этой цикличности приводит к нарушению суточных ритмов и негативно влияет на функционирование всех систем организма. Целью данного исследования было изучение влияния постоянной темноты, воздействие которой начиналось с внутриутробного периода (DD/DD) или с момента рождения (LD/DD) и продолжалось в течение всей жизни, на содержание α -токоферола у крыс линии Вистар в позднем онтогенезе (3, 6, 12, 18 и 24 мес.). Контрольные животные содержались в стандартных световых условиях (LD). Уровень α -токоферола определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Модулирующее влияние длительной световой депривации обнаружено в печени, скелетной мышце и легких, большинство изменений наблюдалось у 12-месячных крыс. Так, в печени уровень витамина снижался в обеих экспериментальных группах, что связано, вероятно, с регулирующей ролью органа в поддержании гомеостаза витамина Е в организме. В скелетной мышце крыс из группы DD/DD отмечено значительное повышение содержания α -токоферола. Это может свидетельствовать о накоплении в миоцитах липидов в результате нарушения гомеостаза основных энергетических субстратов скелетных мышц. У 24-месячных крыс этой группы уровень витамина в ткани был значительно ниже, чем в контроле, что может указывать на снижение антиоксидантной защиты скелетной мышцы вследствие возрастных изменений. У крыс, на которых воздействие постоянной темноты начиналось после рождения, наблюдались отличия по сравнению с контрольной группой в направленности изменений уровня α -токоферола в легких в возрасте 6 и 12 мес. У стареющих и старых животных воздействие световой депривации, вероятно, сглаживалось возрастными нарушениями в функционировании циркадной системы, поэтому в большинстве исследованных органов содержание витамина не различалось у крыс контрольной и экспериментальных групп. Полученные данные могут быть полезны при оценке физиологического состояния людей, работающих или проживающих в условиях пониженной освещенности.

Ключевые слова: α -токоферол, старение, световая депривация, постнатальный онтогенез, крысы Вистар

DOI: 10.31857/S0869813922100028

Витамин Е (α -токоферол) выполняет в организме ряд специфических функций, среди которых участие в клеточной сигнализации, модуляция транскрипции ге-

нов, этот витамин также является антиоксидантом, защищающим липидные компоненты биологических мембран [1, 2]. Особенно актуальной роль этого витамина становится при старении, когда вследствие изменения состава мембраны и накопления в ней продуктов перекисного окисления липидов изменяется ее физическое состояние и нарушается функционирование [3]. Подавляя окисление клеточных макромолекул, витамин Е, наряду с другими компонентами системы антиоксидантной защиты, способствует поддержанию баланса между уровнями свободных радикалов и антиоксидантов, обеспечивающего клеточный гомеостаз и замедляющего старение [1]. Установлено, что более высокий уровень витамина Е в организме снижает риск развития такой возрастной патологии скелетных мышц, как саркопения [4].

Важную роль в процессах старения играет циркадная система, синхронизирующая различные биологические процессы в организме с факторами окружающей среды, основным из которых является цикл света и темноты. Под циркадным контролем находится функционирование эндокринной системы и обмен основных питательных веществ [5, 6], в том числе липидов, с которыми тесно связан метаболизм витамина Е. Нарушение циркадных ритмов приводит к десинхронизации множества физиологических процессов и изменению гормонального статуса, в особенности это касается мелатонина, синтезируемого эпифизом в темное время суток [7, 8]. Как и витамин Е, мелатонин и его метаболиты обладают антиоксидантными свойствами и способны напрямую взаимодействовать со свободными радикалами, а также регулировать экспрессию генов некоторых ферментов антиоксидантной защиты и стимулировать синтез глутатиона [7]. Действуя через свои рецепторы, которые экспрессируются по всему организму, мелатонин участвует в регуляции энергетического метаболизма, в том числе поддерживает гомеостаз глюкозы [9].

В условиях постоянной темноты отсутствие световых сигналов приводит к появлению так называемых “свободно текущих” циркадных ритмов, при которых может нарушаться функционирование различных физиологических систем [10, 11]. Функционирование циркадной системы в “свободном режиме” наблюдается у большинства полностью слепых людей [12], а также длительно работающих в условиях пониженной освещенности или проживающих на территориях Крайнего Севера в период полярной ночи [13]. Исследования возможных нарушений, возникающих при воздействии постоянной темноты на организм, активно проводятся на моделях животных, у которых циркадные ритмы уже сформированы в условиях стандартного фотопериода (12 ч свет/12 ч темнота), а продолжительность действия этого фактора чаще всего не превышает 6–10 нед. [14–16]. При этом значительный интерес представляет изучение влияния световой депривации в процессе индивидуального развития организма. Важным моментом является и то, в какой период онтогенеза начинается воздействие. Известно, что циркадные ритмы начинают формироваться уже в пренатальный период при участии циркадной системы матери, а собственная система хронометража “созревает” у грызунов в течение первых двух недель после рождения. Условия освещения, которые воздействуют на организм в течение первых трех недель постнатального развития, оказывают формирующее влияние не только на функционирование циркадной системы, но и на физиологию и поведение во взрослом возрасте [16, 17]. В связи с этим выявление долгосрочных эффектов пренатальной и ранней постнатальной световой среды представляет особый интерес для лучшего понимания потенциальных последствий для здоровья измененных условий освещения. Ранее мы сообщали, что при действии постоянной темноты на самок крыс во время беременности (внутриутробный период) у их потомства наблюдалось значительное снижение уровня α -токоферола на ранних этапах постнатального онтогенеза. Более позднее воздействие

световой депривации (с рождения) вызывало меньше изменений в уровне витаминов [18]. Целью данного исследования было изучение влияния постоянной темноты, воздействие которой начиналось с внутриутробного периода или с момента рождения и продолжалось в течение всей жизни, на содержание α -токоферола у крыс в позднем онтогенезе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте использовали крыс линии Вистар, которые находились в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище (гранулированный корм). Все манипуляции с животными соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по гуманному обращению с животными Института биологии КарНЦ РАН, ФИЦ “Карельский научный центр РАН”.

Для разведения 4-месячных самцов и самок крыс содержали в условиях стандартного фиксированного режима освещения (12 ч свет 750 лк/12 ч темнота; LD) или при постоянной темноте (0–0.5 лк, DD). Самок, содержавшихся при стандартном освещении, и их потомство сразу после рождения в случайном порядке разделили на две группы и либо оставили в тех же световых условиях (LD, контроль), либо перенесли в постоянную темноту (LD/DD). Самок и потомство, рожденное в постоянной темноте, оставили в тех же условиях (DD/DD). В возрасте 3, 6, 12, 18 и 24 мес. у потомства из каждой группы (во всех группах $n = 6$; по 3 самца и 3 самки) после декапитации были собраны кровь и образцы тканей печени, почек, сердца, скелетной мышцы, легких и селезенки. Все манипуляции в условиях постоянной темноты проводились при красном свете (не более 0.5 лк).

Исследования выполнены с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”. Содержание α -токоферола определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для анализа содержания витаминов в тканях животных готовили 10%-ный гомогенат: навеску ткани (100 мг) гомогенизировали в 0.9 мл 0.25 М раствора сахарозы (рН 7.4), содержащей 0.001 М этилендиаминтетрауксусной кислоты. В конические полиэтиленовые пробирки вносили 0.25 мл гомогената или сыворотки крови, добавляли 0.25 мл 0.025%-ного раствора бутилокситолуола в этаноле, тщательно смешивали содержимое пробирки для осаждения белков, затем добавляли 0.5 мл 0.0125%-ного раствора бутилокситолуола в *n*-гексане, встряхивали в течение 5 мин, затем центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин и оставляли образцы на холоде на 40 мин. Концентрацию витамина определяли в гексановом слое на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром 6 (Россия) с ультрафиолетовым детектором при длине волны 292 нм. Элюентом служила смесь гексана с изопропанолом (98.5 : 1.5). Количественную оценку содержания α -токоферола проводили методом внешнего стандарта (Sigma, США) с использованием системы регистрации и обработки хроматографических данных UniChrom 4.x-5.

Полученные данные обрабатывались с использованием пакетов программ MS Excel 2007 и Statgraphics 5.0 общепринятыми методами вариационной статистики и представляли в виде $M \pm m$. Оценку достоверности различий между группами и крысами разного возраста проводили с применением критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Для выявления зависимостей и их характера между изучаемыми показателями в каждом световом режиме использовали корреляционный анализ. Влияние факторов “возраст”, “световой режим” и “пол” оценивали с помощью многофакторного дисперсионного анализа (MANOVA). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

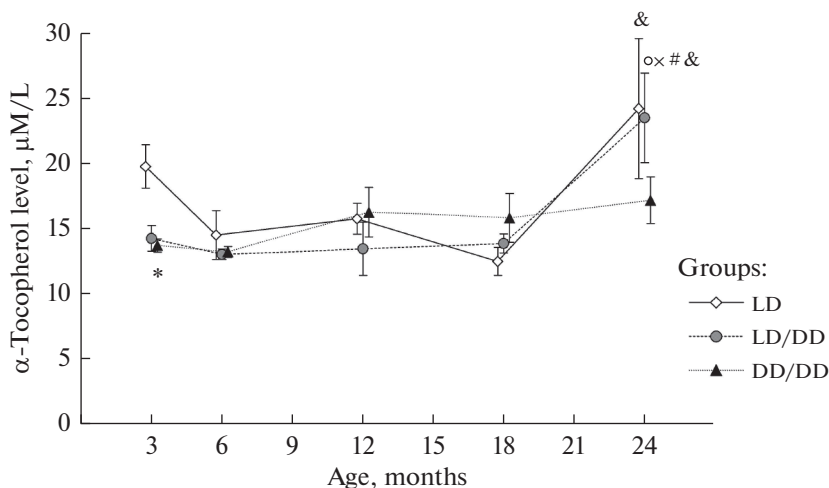


Рис. 1. Возрастные изменения содержания α -токоферола в сыворотке крови крыс при разных световых режимах.

Здесь и на рис. 2: различия достоверны по сравнению * – с группой LD, o – с возрастом 3 мес., x – 6 мес., # – 12 мес., & – 18 мес. ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованные периоды онтогенеза в сыворотке крови у 24-месячных крыс в группах LD и LD/DD обнаружено повышение содержания α -токоферола (рис. 1). У контрольных животных в этом возрасте уровень витамина был значительно выше, чем у 18-месячных, тогда как в группе LD/DD разница была достоверной по сравнению со всеми предыдущими возрастными периодами ($p < 0.05$). В 3-месячном возрасте у крыс группы DD/DD концентрация витамина была значительно ниже, чем у контрольных ($p < 0.05$).

В печени содержание α -токоферола у контрольных крыс с возрастом увеличивалось (рис. 2а), значительные различия обнаружены у 12- и 24-месячных животных по сравнению с 3-месячными ($p < 0.05$). В условиях постоянной темноты уровень витамина у животных повышался в 6-месячном возрасте, а в 12 месяцев наблюдалось его существенное снижение, в группе LD/DD эти изменения были достоверными ($p < 0.05$). В 18- и 24-месячном возрасте содержание α -токоферола в обеих экспериментальных группах увеличивалось, по сравнению с 12-месячным ($p < 0.05$). В группах LD/DD и DD/DD уровень витамина в 12 месяцев был значительно ниже, чем в контроле ($p < 0.05$).

В почках во всех трех группах наблюдалось повышение уровня α -токоферола в 12-месячном возрасте (рис. 2б). Затем в экспериментальных группах содержание витамина снижалось, однако статистически значимо лишь в группе LD/DD, где у крыс самого старшего возраста различия были достоверными по сравнению с 6-, 12- и 18-месячными ($p < 0.05$). Уровень α -токоферола в сердце у животных всех исследованных групп в 3-месячном возрасте был самым низким (рис. 2с). В контрольной группе содержание витамина повышалось в 6-месячном возрасте ($p < 0.05$), а затем изменялось незначительно. В группе DD/DD уровень витамина увеличивался в течение всей жизни и у 24-месячных крыс был значительно выше, чем у 6-месячных ($p < 0.05$). У крыс LD/DD достоверное повышение по сравнению с 3-месячным возрастом выявлено в 12 и 18 месяцев. В селезенке крыс из групп LD и LD/DD не

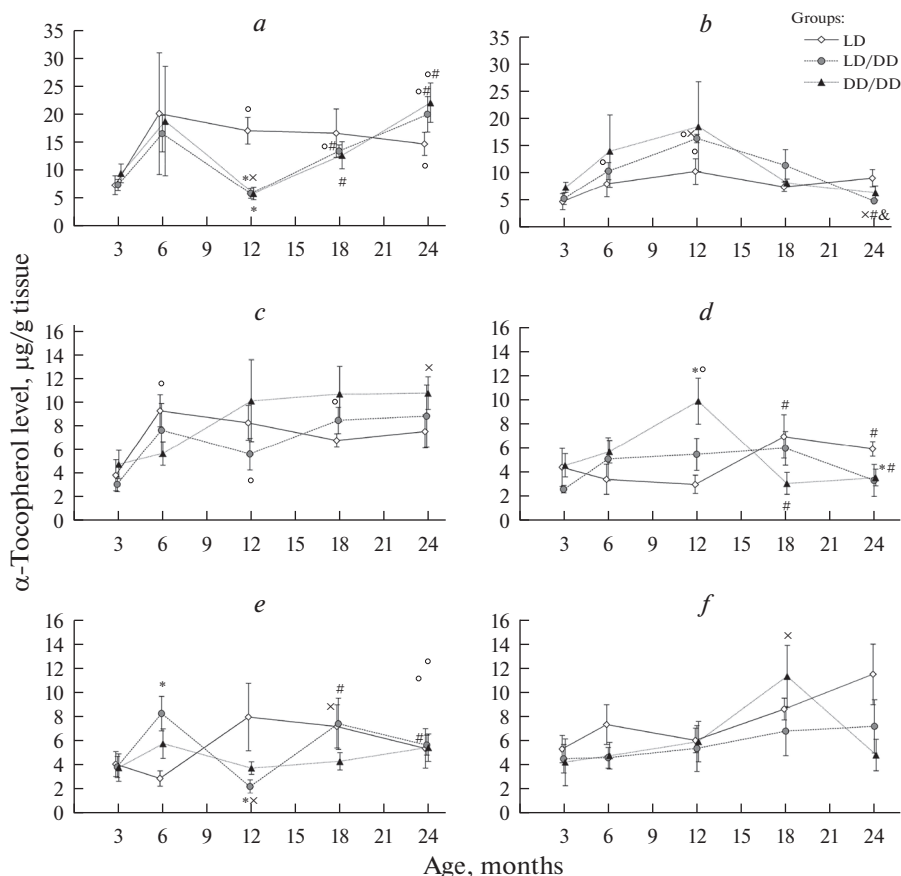


Рис. 2. Возрастные изменения содержания α -токоферола в печени (a), почках (b), сердце (c), скелетной мышце (d), легких (e) и селезенке (f) крыс при разных световых режимах.

было обнаружено статистически значимых возрастных изменений уровня α -токоферола (рис. 2f). У 18-месячных крыс группы DD/DD содержание витамина было значительно выше, чем у 6-месячных ($p < 0.05$). Влияния условий освещения на содержание α -токоферола в почках, сердце и селезенке в исследованные возрастные периоды выявлено не было.

В скелетной мышце контрольных крыс содержание α -токоферола значительно повышалось после 12-месячного возраста ($p < 0.05$, рис. 2d). У крыс DD/DD содержание α -токоферола существенно увеличивалось уже в 12 мес. ($p < 0.05$) и было выше, чем в контроле ($p < 0.05$). В 18 и 24 мес. уровень витамина снижался по сравнению с 12-месячными ($p < 0.05$) и у крыс самого старшего возраста был ниже, чем у контрольных ($p < 0.05$). В группе LD/DD существенных возрастных изменений уровня α -токоферола обнаружено не было.

В легких контрольных крыс содержание α -токоферола увеличивалось после 6-месячного возраста и в 18 месяцев было значительно выше, чем в 6 ($p < 0.05$, рис. 2e). В группе LD/DD повышение уровня витамина наблюдалось уже в 6-месячном возрасте, а к 12 месяцам его содержание резко снижалось ($p < 0.05$). В эти возрастные периоды зафиксированы достоверные различия в уровне α -токоферола по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$). В 18 и 24 мес. содержание витамина было

Таблица 1. Результаты дисперсионного анализа по влиянию факторов “возраст”, “световой режим” и “пол” на содержание α -токоферола в органах и тканях крыс

Орган/ткань	Факторы ($\eta\%$, F, p)					
	возраст (A)	световой режим (Б)	пол (B)	АБ	АВ	БВ
Сыворотка крови	23.6%, 7.7, $p < 0.001$				8.3%, 2.7, $p < 0.05$	
Печень	14.3%, 3.2, $p < 0.05$					
Почки	17.2%, 4.1, $p < 0.01$					
Сердце	15.0%, 4.0, $p < 0.01$				11.6%, 3.1, $p < 0.05$	
Скелетная мышца			3.8%, 4.4, $p < 0.05$	25.7%, 3.7, $p < 0.01$		
Селезенка	13.8%, 3.7, $p < 0.01$					7.9%, 4.3, $p < 0.05$

значительно выше, чем в 12-месячном возрасте ($p < 0.05$) и практически совпадало с показателями контрольной группы. У крыс DD/DD не было обнаружено возрастных изменений содержания α -токоферола в легких.

Многофакторный дисперсионный анализ (табл. 1) показал, что возраст и пол животных, а также световой режим оказывали в разной степени выраженное влияние на содержание α -токоферола в сыворотке крови и тканях органов. Большинство изменений было вызвано возрастом, в то время как световой режим оказывал модулирующее влияние на содержание витамина только в скелетной мышце. В легких статистически значимого влияния исследуемых факторов на уровень α -токоферола выявлено не было. В результате корреляционного анализа (рис. 3) обнаружено сравнительно высокое количество зависимостей между изучаемыми показателями у крыс, которых поместили в условия постоянной темноты после рождения. В этой группе наибольшее число связей выявлено с основным депонирующим и регулирующим статусом витамина Е органом — печенью.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучению возрастной динамики содержания витамина Е в связи с его способностью поддерживать клеточную функцию при старении уделяется большое внимание. Данные литературы, касающиеся возрастных изменений уровня α -токоферола в тканях противоречивы. Во многих исследованиях сообщается о возрастном увеличении концентрации витамина в крови [19, 20], что в основном связано с механизмами, контролирующими циркулирующие липиды [21], содержание которых в крови повышается с возрастом [22]. В нашем исследовании содержание α -токоферола в сыворотке крови увеличивалось у 24-месячных крыс в контрольной группе и находившихся в условиях световой депривации с момента рождения. В 3-месячном возрасте уровень витамина в крови крыс групп LD/DD и DD/DD был ниже, чем у контрольных, что могло являться следствием снижения у них содержания α -токоферола на ранних этапах постнатального онтогенеза под влиянием постоянной темноты [18].

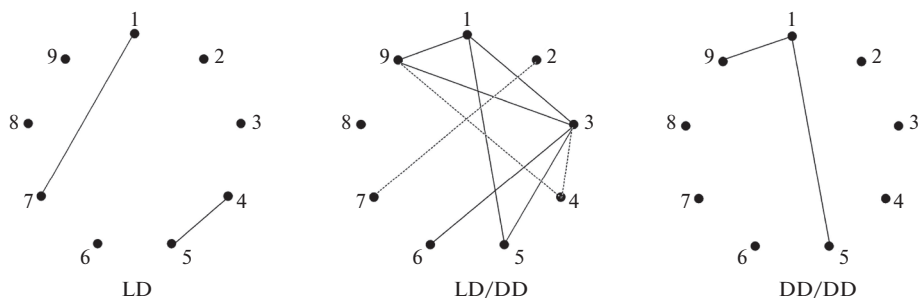


Рис. 3. Влияние световых режимов на корреляционные зависимости между изученными показателями. 1 – возраст животных, 2 – пол животных; содержание α -токоферола в: 3 – печени, 4 – почках, 5 – сердце, 6 – легких, 7 – селезенке, 8 – скелетной мышце, 9 – сыворотке крови; сплошная линия – положительная корреляция, пунктирная линия – отрицательная корреляция; LD, LD/DD, DD/DD – группы животных. Отражены только значимые зависимости ($p < 0.05$).

Известно, что уровень витамина Е в тканях также зависит от содержания в них липидов [23], а при старении вследствие нарушения дифференцировки преадипоцитов белой жировой ткани в организме происходит перераспределение липидов и накопление их в органах, таких как печень, сердце и скелетные мышцы [24, 25]. Рядом авторов было установлено значительное увеличение уровня витамина Е в печени, почках и сердце старых крыс и мышей [26–28]. В своей работе Linard с соавт. [28] пришли к выводу, что повышение содержания витамина Е в микросомальной мембране печени связано со снижением перекисных процессов в связи с возрастным уменьшением доли n-6 полиненасыщенных жирных кислот в мембранных фосфолипидах и наблюдалось при сбалансированном содержании в корме крыс линолевой и α -линоленовой кислот. В другом исследовании в печени 12- и 24-месячных крыс показатели перекисного окисления липидов были значительно выше, а уровень эндогенных антиоксидантов ниже, чем у 3-месячных [29]. В сердечной мышце крыс было зарегистрировано возрастное снижение содержания α -токоферола, что сопровождалось повышением окислительных повреждений митохондрий [30]. В печени и сердце мышей после 6-месячного возраста было выявлено уменьшение уровня α -токоферола, нормализованного по содержанию триглицеридов [31]. Другими авторами не было обнаружено различий в уровне витамина Е в печени и сердце между молодыми (3-месячными) и старыми (20-месячными) крысами [32]. Вероятно, одним из важнейших факторов, определяющих содержание витамина Е в тканях является интенсивность перекисных процессов, которая во многом зависит от природы жирных кислот, поступающих в организм с пищей [28, 33].

В нашем исследовании в стандартных условиях освещения содержание α -токоферола у взрослых и старых крыс было выше, чем у молодых в печени, почках и сердце. В скелетной мышце уровень витамина увеличивался после 12-месячного возраста, а в легких у крыс старше 6 месяцев. Длительная световая депривация модулировала возрастные изменения содержания α -токоферола в печени, скелетной мышце и легких. При этом у 12-месячных крыс различия с контрольной группой наблюдались в тканях всех этих органов: более низкие значения в печени в обеих экспериментальных группах и в легких в группе LD/DD, более высокое значение в скелетной мышце в группе DD/DD.

Регулярно чередующиеся циклы света и темноты синхронизируют циркадные часы организма, которые генерируют примерно 24-часовые суточные ритмы поведения, физиологических и обменных процессов. В условиях постоянной темноты циркад-

ные ритмы сохраняются, однако в отсутствие световых стимулов являются “свободно текущими” и отличаются от 24-часового ритма [10, 12]. В печени циркадные ритмы в первую очередь определяются графиком кормления [34], однако цикл света и темноты является необходимым условием для автономного функционирования циркадных часов органа [35]. Установлено, что у мышей, находившихся в условиях постоянной темноты в течение 6 недель, в печени эндогенный циркадный ритм часовых генов, генов системы цитохрома P 450 и метаболизма липидов устойчиво сохраняется, однако немного изменяется период и амплитуда их колебаний [14]. На уровне организма, нарушение синхронности в функционировании центральных и периферических циркадных часов может нарушать метаболический гомеостаз [14, 36].

Печень и скелетные мышцы считаются основными метаболическими тканями, поэтому их скоординированное функционирование является решающим условием нормального протекания обменных процессов [37]. В печени часовыми генами регулируется множество метаболических путей – от дыхания митохондрий, биогенеза рибосом и секреции белков до специфических для гепатоцитов функций, таких как липогенез, детоксикация ксенобиотиков, синтез холестерина и желчных кислот [6]. Циркадные часы скелетных мышц, регулирующие процессы транскрипции, обмен веществ, в том числе гомеостаз липидов, а также миогенную способность модулируются условиями освещения посредством нейрогуморальных и температурных сигналов [37, 38]. В экспериментах на моделях с нарушениями молекулярных часов чаще всего патологии возникают именно в скелетных мышцах [39]. Установлено, что у мышей с дефицитом в скелетных мышцах гена *Bmal 1* снижается утилизация тканью глюкозы и активируется более энергоемкий путь окисления жирных кислот, что приводит к уменьшению уровня циркулирующих липидов и их запаса в печени [36, 38].

Печень играет центральную роль в регуляции распределения и экскреции различных форм витамина E, который метаболизируется подобно ксенобиотикам [2]. Значительное снижение содержания α -токоферола в печени 12-месячных крыс, содержащихся в постоянной темноте, может быть связано либо со снижением его всасывания в кишечнике и поглощения печенью, либо с усиленным расщеплением. Известно, что в регуляции процессов абсорбции и транспорта липидов, в том числе витамина E, принимают участие часовые гены [5]. Вместе с тем отсутствие различий между группами в уровне витамина в сыворотке крови и значительное повышение его содержания в скелетной мышце у крыс группы DD/DD может свидетельствовать о перераспределении α -токоферола между печенью и скелетной мышцей. У 12-месячных крыс группы LD/DD уровень витамина в этой ткани также был выше, чем в контроле, однако разница не была статистически значимой. Увеличение содержания α -токоферола в скелетной мышце может быть связано с накоплением в миоцитах липидов, когда поглощение жирных кислот превышает скорость их окисления [40]. Важную роль в доставке α -токоферола в периферические ткани из липопротеинов и хиломикроннов играет липопротеиновая липаза, контролирующая поглощение жирных кислот тканями в соответствии с их потребностями. Скелетные мышцы являются одним из основных мест экспрессии этого фермента, активность которого регулируется множеством факторов, в том числе циркадным ритмом [40, 41]. Чрезмерное поступление липидов может приводить к метаболической дисфункции скелетных мышц, нарушению энергетического баланса в организме, что является потенциальной причиной метаболического синдрома [41, 42]. При этом возникновение в мышечной ткани резистентности к инсулину, являющейся первопричиной развития этого заболевания, связывают с накоплением в миоцитах внутриклеточных метаболитов жирных кислот и нарушением окислительно-восстановительного баланса [43, 44]. Вероятно, это могло быть причиной значительного снижения содержания α -токоферола в ске-

летней мышце крыс в группе DD/DD к 18-месячному возрасту, который оставался примерно на том же уровне у 24-месячных животных и был существенно ниже, чем в контроле. У 24-месячных крыс группы LD/DD уровень α -токоферола в скелетной мышце также снижался до значений, сопоставимых с группой DD/DD, однако существенных различий с контролем обнаружено не было. Следует отметить, что метаболические нарушения часто сопровождаются изменениями массы тела [44]. В процессе исследования нами не было зафиксировано значимых различий массы тела между крысами контрольной и экспериментальных групп (данные не приводятся).

Помимо печени и скелетной мышцы, модулирующее действие длительной световой депривации на содержание α -токоферола было обнаружено в легких у крыс группы LD/DD в возрасте 6 и 12 мес. В раннем онтогенезе уровень витамина в легких у животных обеих экспериментальных групп был ниже, чем у контрольных [18]. В 3 мес. эта разница нивелировалась, а в возрасте 6 и 12 мес. наблюдались отличия в направленности изменений уровня α -токоферола между контрольной и LD/DD группами. То, что влияние световой депривации на содержание витамина E в позднем онтогенезе проявилось в группе, помещенной в экспериментальные условия после рождения, связано, вероятно, с особенностями постнатального развития легких. У крыс альвеоляризация этого органа продолжается до 60-го дня [45], а конец второй постнатальной недели считается наиболее уязвимым периодом в развитии дыхательной системы, когда происходит структурно-функциональное становление систем, контролирующих дыхание [46]. Нарушение в этот период взаимосвязанных нейроэндокринной, вегетативной и иммунной систем может привести к повышенной реактивности и чувствительности дыхательных путей к воспалению, а также к снижению функции легких во взрослом возрасте [47]. В течение первых двух недель после рождения заканчивается формирование собственной циркадной системы. Важную роль в этом процессе играют материнский мелатонин, поступающий с молоком, а с началом функционирования фоторецепторов сетчатки важны и условия освещения [17]. В связи с пластичностью циркадной системы в данном возрасте воздействующие на организм факторы, такие как уровень мелатонина и световые условия, могут оказывать долгосрочные эффекты на различные физиологические системы. В плодный и ранний постнатальный периоды мелатонин действует как нейроэндокринный модификатор нервной, сердечно-сосудистой, иммунной систем, а также энергетического метаболизма [48]. Экспериментально показано, что при отсутствии световых импульсов в течение 10 дней концентрация мелатонина в крови крыс увеличивается [49]. Можно предположить, что в нашем исследовании изменения в содержании α -токоферола в легких в позднем онтогенезе у крыс, помещенных в постоянную темноту после рождения, связаны с влиянием повышенного уровня мелатонина, поступающего с молоком матери, и модификацией в функционировании циркадной системы, вызванной отсутствием света. Известно, что антиоксидантная функция витамина E в защите мембранных липидов от окислительных повреждений становится еще более актуальной в легких, которые непосредственно подвергаются воздействию кислорода, а также различных оксидантов и микроорганизмов, содержащихся в воздухе. Ткань легких и альвеолярный сурфактант содержат большое количество ненасыщенных жирных кислот, которые являются субстратом для перекисного окисления липидов [50]. У крыс контрольной группы уровень α -токоферола в легких повышался с возрастом, что согласуется с данными литературы [51]. Резкие изменения содержания витамина у 6- и 12-месячных крыс группы LD/DD являются, вероятно, результатом реакции антиоксидантной системы легких, свидетельствующим о нарушениях в функционировании дыхательной системы в этом возрасте. Причем увеличение уровня α -токоферола может наблюдаться в результате его мобилизации из других тканей в случае повышенной потребности при каких-либо экстремальных воздействиях [50].

В нашем исследовании большинство различий с контрольной группой в содержании α -токоферола было обнаружено у 12-месячных крыс. С возрастом в организме происходит ряд метаболических изменений, большинство которых у крыс наблюдается к концу первого года жизни, а нарушения циркадной ритмичности, вероятно, способствуют определенным процессам, усугубляющим эти изменения. В печени обнаружено снижение уровня транскриптов генов, кодирующих ферменты семейства цитохрома P 450 [52]. В крови самцов крыс Вистар выявлено значительное усиление окислительного стресса в возрастном периоде между 8 и 12 мес. [53]. У 12-месячных самок крыс в печени, почках, сердце и легких наблюдались более высокие уровни вызванного окислительным стрессом повреждения белков, липидов и ДНК и низкая антиоксидантная эффективность по сравнению с молодыми 3-месячными животными [54]. Мы не обнаружили влияния условий освещения на уровень α -токоферола в большинстве исследованных органов у крыс старшего возраста (18 и 24 мес.). Старение связано с нарушениями в функционировании циркадной системы, что проявляется в уменьшении амплитуды, фазы и продолжительности периода циркадных ритмов, повышении тенденции к внутренней десинхронизации и нарушении синхронизации с окружающей средой [34]. Как сообщают Nakamura и соавт. [55], регулярно повторяющиеся циклы света и темноты маскируют некоторые возрастные нарушения циркадных колебаний часовых генов в супрахиазматических ядрах мышей, которые проявляются в условиях световой депривации. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что у старых крыс содержание в условиях постоянной темноты повлияло на уровень α -токоферола в скелетной мышце, что может быть связано с ролью мышц в обмене основных метаболических субстратов в организме.

Таким образом, модулирующее влияние длительной световой депривации на возрастную динамику содержания α -токоферола было обнаружено в печени, скелетной мышце и легких, причем большинство изменений наблюдалось у 12-месячных крыс. В обеих экспериментальных группах в этом возрасте уровень витамина значительно снижался в печени, а в группе DD/DD увеличивался в скелетной мышце. Вероятно, длительное нахождение в условиях постоянной темноты привело к нарушению гомеостаза основных энергетических субстратов скелетных мышц, что вызвало накопление в миоцитах липидов и α -токоферола. Эти метаболические нарушения могли являться причиной возрастных изменений в мышечной функции у старых животных, которые привели к значительному снижению уровня витамина у 24-месячных крыс в группе DD/DD. Воздействие световой депривации с момента рождения повлияло на возрастные изменения уровня α -токоферола в легких 6- и 12-месячных крыс, что может быть связано с особенностями постнатального развития этих органов. У стареющих и старых животных воздействие постоянной темноты, вероятно, сглаживается возрастными нарушениями в функционировании циркадной системы, поэтому в большинстве исследованных органов изменения в содержании витамина отсутствовали. Выявленные в результате исследования особенности возрастной динамики уровня α -токоферола в организме крыс, содержащихся в постоянной темноте, подтверждают важную роль циркадных ритмов в обменных процессах. Полученные данные могут быть полезны при оценке физиологического состояния людей, работающих или проживающих в условиях пониженной освещенности.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема FMEN-2022-0003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.А.Х., В.А.И.), сбор данных (И.В.Б., Е.А.Х., Т.Н.И.), обработка данных (И.В.Б., Т.Н.И.), написание и редактирование манускрипта (И.В.Б., Е.А.Х., Т.Н.И., В.А.И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Ostan R, Cevenini E, Gonos ES, Franceschi C, Monti D* (2014) Vitamin E – gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: Implications for treatment. A systematic review. *Ageing Res Rev* 14: 81–101.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.01.001>
2. *Traber MG* (2013) Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *J Lipid Res* 54(9): 2295–2306.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R032946>
3. *Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA* (2007) Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *Physiol Rev* 87: 1175–1213.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2006>
4. *Mulligan AA, Hayhoe RPG, Luben RN, Welch AA* (2021) Positive Associations of Dietary Intake and Plasma Concentrations of Vitamin E with Skeletal Muscle Mass, Heel Bone Ultrasound Attenuation and Fracture Risk in the EPIC-Norfolk Cohort. *Antioxidants* 10(2): 159.
<https://doi.org/10.3390/antiox10020159>
5. *Hussain MM, Pan X* (2015) Circadian regulation of macronutrient absorption. *J Biol Rhythms* 30(6): 459–469.
<https://doi.org/10.1177/0748730415599081>
6. *Janich P, Meng Q-J, Benitah SA* (2014) Circadian control of tissue homeostasis and adult stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 31: 8–15.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.06.010>
7. *Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B* (2017) Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cell Mol Life Sci* 74: 3863–3881.
<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2609-7>
8. *Анисимов ВН* (2008) Молекулярные и физиологические механизмы старения (в 2-х т.). СПб. Наука. Т 1. [Anisimov VN (2008) Molecular and Physiological Mechanisms of Aging. St Petersburg. Nauka. V 1. (In Russ)].
9. *Owino S, Buonfiglio DDC, Tehio C, Tosini G* (2019) Melatonin Signaling a Key Regulator of Glucose Homeostasis and Energy Metabolism. *Front Endocrinol* 10: 488.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00488>
10. *González MMC* (2018) Dim Light at Night and Constant Darkness: Two Frequently Used Lighting Conditions That Jeopardize the Health and Well-being of Laboratory Rodents. *Front Neurol* 9: 609.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00609>
11. *Tapia-Osorio A, Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Escobar C* (2013) Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behav Brain Res* 252: 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.028>
12. *Hartley S, Dauvilliers Y, Quera-Salva M-A* (2018) Circadian Rhythm Disturbances in the Blind. *Curr Neurol Neurosci Rep* 18: 65.
<https://doi.org/10.1007/s11910-018-0876-9>
13. *Lockley SW, Arendt J, Skene DJ* (2007) Visual impairment and circadian rhythm disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 9(3): 301–314.
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2007.9.3/slockley>
14. *Li H, Zhang S, Zhang W, Chen S, Rabearivony A, Shi Y, Liu J, Corton CJ, Liu C* (2020) Endogenous circadian time genes expressions in the liver of mice under constant darkness. *BMC Genomics* 21: 224.
<https://doi.org/10.1186/s12864-020-6639-4>
15. *Talaei SA, Azami A, Salami M* (2016) Developmental effect of light deprivation on synaptic plasticity of rats' hippocampus: implications for melatonin. *Iran J Basic Med Sci* 19: 899–909.

16. *Bishnupuri KS, Haldar C* (2000) Impact of photoperiodic exposures during late gestation and lactation periods on the pineal and reproductive physiology of the Indian palm squirrel, *Funambulus pennant*. *J Reprod Fertil* 118: 295–301.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1180295>
17. *Brooks E, Canal MM* (2013) Development of circadian rhythms: Role of postnatal light environment. *Neurosci Biobehav Rev* 37: 551–560.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.02.012>
18. *Baishnikova IV, Ilyina TN, Khizhkin EA, Ilyukha VA, Vinogradova IA* (2021) Effect of Long-Term Light Deprivation on α -Tocopherol Content in Rats during Ontogeny. *Bull Exp Biol Med* 170(3): 294–298.
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05054-1>
19. *Stuetz W, Weber D, Dollé MET, Jansen E, Grubeck-Loebenstien B, Fiegl S, Toussaint O, Bernhardt J, Gonos ES, Franceschi C, Sikora E, Moreno-Villanueva M, Breusing N, Grune T, Bürkle A* (2016) Plasma Carotenoids, Tocopherols, and Retinol in the Age-Stratified (35–74 Years) General Population: A Cross-Sectional Study in Six European Countries. *Nutrients* 8(10): 614.
<https://doi.org/10.3390/nu8100614>
20. *Grolier P, Boirie Y, Leivadoux E, Brandolini M, Borel P, Azais-Braesco V, Beaufrère B, Ritz P* (2000) Age-related changes in plasma lycopene concentrations, but not in vitamin E, are associated with fat mass. *Br J Nutr* 84: 711–716.
<https://doi.org/10.1017/S0007114500002063>
21. *Traber MG, Leonard SW, Bobe G, Fu X, Saltzman E, Grusak MA, Booth SL* (2015) α -Tocopherol disappearance rates from plasma depend on lipid concentrations: studies using deuterium-labeled collard greens in younger and older adults. *Am J Clin Nutr* 101(4): 752–759.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.114.100966>
22. *Nesic DM, Stevanovic DM, Stankovic SD, Milosevic VL, Trajkovic V, Starcevic VP, Severs WB* (2013) Age-dependent modulation of central ghrelin effects on food intake and lipid metabolism in rats. *Eur J Pharmacol* 710: 85–91.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.052>
23. *Szewczyk K, Chojnacka A, Górnicka M* (2021) Tocopherols and Tocotrienols – Bioactive Dietary Compounds; What Is Certain, What Is Doubt? *Int J Mol Sci* 22: 6222.
<https://doi.org/10.3390/ijms22126222>
24. *Zhao L, Zou X, Feng Z, Luo C, Liu J, Li H, Chang L, Wang H, Li Y, Long J, Gao F, Liu J* (2014) Evidence for association of mitochondrial metabolism alteration with lipid accumulation in aging rats. *Exp Gerontol* 56: 3–12.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.02.001>
25. *Kim JY, Kim DH, Choi J, Park J-K, Jeong K-S, Leeuwenburgh C, Yu BP, Chung HY* (2009) Changes in lipid distribution during aging and its modulation by calorie restriction. *Age* 31: 127–142.
<https://doi.org/10.1007/s11357-009-9089-0>
26. *König J, Besoke F, Stuetz W, Malarski A, Jahreis G, Grune T, Höhn A* (2016) Quantification of age-related changes of α -tocopherol in lysosomal membranes in murine tissues and human fibroblasts. *Biofactors* 42(3): 307–315.
<https://doi.org/10.1002/biof.1274>
27. *van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Skepper JN, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, Lüscher TF* (2002) Cardiovascular Aging Is Associated With Vitamin E Increase. *Circulation* 105: 1635–1638.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000014986.29834.71>
28. *Linard A, Macaire J-P, Christon R* (2001) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity and vitamin E level in the liver microsomal membrane: effects of age and dietary α -linolenic acid deficiency. *J Nutr Biochem* 12: 481–491.
[https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(01\)00165-6](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(01)00165-6)
29. *Manikonda PK, Jagota A* (2012) Melatonin administration differentially affects age-induced alterations in daily rhythms of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male rat liver. *Biogerontology* 13: 511–524.
<https://doi.org/10.1007/s10522-012-9396-1>
30. *Kamzalov S, Sohal RS* (2004) Effect of age and caloric restriction on coenzyme Q and α -tocopherol levels in the rat. *Exp Gerontol* 39(8): 1199–1205.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.04.007>
31. *Takahashi K, Takisawa S, Shimokado K, Kono N, Arai H, Ishigami A* (2017) Age-related changes of vitamin E: α -tocopherol levels in plasma and various tissues of mice and hepatic α -tocopherol transfer protein. *Eur J Nutr* 56: 1317–1327.
<https://doi.org/10.1007/s00394-016-1182-4>
32. *Çoban J, Öztezcan S, Doğru-Abbasoğlu S, Bingül I, Yeşil-Mizrak I K, Uysal M* (2014) Olive leaf extract decreases age-induced oxidative stress in major organs of aged rats. *Geriatr Gerontol Int* 14(4): 996–1002.
<https://doi.org/10.1111/ggi.12192>

33. Navarro-Hortal MD, Ramírez-Tortosa CL, Varela-López A, Romero-Márquez JM, Ochoa JJ, Ramírez-Tortosa MC, Forbes-Hernández TY, Granados-Principal S, Battino M, Quiles JL (2019) Heart Histopathology and Mitochondrial Ultrastructure in Aged Rats Fed for 24 Months on Different Unsaturated Fats (Virgin Olive Oil, Sunflower Oil or Fish Oil) and Affected by Different Longevity. *Nutrients* 11: 2390.
<https://doi.org/10.3390/nu11102390>
34. Sadria M, Layton AT (2021) Aging affects circadian clock and metabolism and modulates timing of medication. *Science* 24(4): 102245.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102245>
35. Koronowski KB, Kinouchi K, Welz P-S, Smith JG, Zinna VM, Shi J, Samad M, Chen S, Magnan CN, Kinchen JM, Li W, Baldi P, Benitah SA, Sassone-Corsi P (2019) Defining the Independence of the Liver Circadian Clock. *Cell* 177(6): 1448–1462.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.025>
36. Yin H, Li W, Chatterjee S, Xiong X, Saha P, Yechoor V, Ma K (2020) Metabolic-sensing of the skeletal muscle clock coordinates fuel oxidation. *FASEB J* 34(5): 6613–6627.
<https://doi.org/10.1096/fj.201903226RR>
37. Harfmann BD, Schroder EA, Esser KA (2015) Circadian Rhythms, the Molecular Clock, and Skeletal Muscle. *J Biol Rhythms* 30(2): 84–94.
<https://doi.org/10.1177/0748730414561638>
38. Harfmann BD, Schroder EA, Kachman MT, Hodge BA, Zhang X, Esser KA (2016) Muscle-specific loss of Bmal1 leads to disrupted tissue glucose metabolism and systemic glucose homeostasis. *Skelet Muscle* 6: 12.
<https://doi.org/10.1186/s13395-016-0082-x>
39. Andrews JL, Zhang X, McCarthy JJ, McDearmonc EL, Hornberger TA, Russell B, Campbell KS, Arbogast S, Reid MB, Walker JR, Hogenesch JB, Takahashi JS, Essera KA (2010) CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function. *PNAS* 107: 4419090–19095.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1014523107/-/DCSupplemental>
40. Kersten S (2014) Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1841: 919–933.
<https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.03.013>
41. Delezie J, Dumont S, Dardente H, Oudart H, Gréchez-Cassiau A, Klosen P, Teboul M, Delaunay F, Pévet P, Challet E (2012). The nuclear receptor REV-ERB α is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J* 26(8): 3321–3335.
<https://doi.org/10.1096/fj.12-208751>
42. Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, Lutz EP, Kako Y, Velez-Carrasco W, Goldberg JJ, Breslow JL, Shulman GI (2001) Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *PNAS* 98(13): 7522–7527.
<https://doi.org/10.1073ypnas.121164498>
43. Gilbert M (2021) Role of skeletal muscle lipids in the pathogenesis of insulin resistance of obesity and type 2 diabetes. *J Diabetes Invest* 12(11): 1934–1941.
<https://doi.org/10.1111/jdi.13614>
44. Park SS, Seo Y-K (2020) Excess Accumulation of Lipid Impairs Insulin Sensitivity in Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci* 21(6): 1949.
<https://doi.org/10.3390/ijms21061949>
45. Tschanz SA, Salm LA, Roth-Kleiner M, Barré SF, Burri PH, Schittny JC (2014) Rat lungs show a biphasic formation of new alveoli during postnatal development. *J Appl Physiol* 117: 89–95.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01355.2013>
46. Wong-Riley MTT, Liu Q, Gao X (2019) Mechanisms underlying a critical period of respiratory development in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 264: 40–50.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2019.04.006>
47. Wright RJ (2010) Perinatal stress and early life programming of lung structure and function. *Biol Psychol* 84: 46–56.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.01.007>
48. Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Battagello DS, Diniz GB, Andrade-Silva J, Silva S Jr, Matos RA, do Amaral FG, Xavier GF, Bittencourt JC, Reiter RJ, Lucassen PJ, Korosi A, Cipolla-Neto J (2018) The absence of maternal pineal melatonin rhythm during pregnancy and lactation impairs offspring physical growth, neurodevelopment, and behavior. *Horm Behav* 105: 146–156.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.08.006>
49. Farhadi N, Gharghani M, Farhadi Z (2016) Effects of long-term light, darkness and oral administration of melatonin on serum levels of melatonin. *Biomed J* 39: 81–84.
<https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.09.003>
50. Kolleck I, Sinha P, Rüstow B (2002) Vitamin E as an Antioxidant of the Lung Mechanisms of Vitamin E Delivery to Alveolar Type II Cells. *Am J Respir Crit Med* 166(12 Pt 2): S62–S66.
<https://doi.org/10.1164/rccm.2206019>

51. Matsuo M, Gomi F, Dooley MM (1992) Age-related alterations in antioxidant capacity and lipid peroxidation in brain, liver, and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats. *Mech Ageing Dev* 64(3): 273–292.
[https://doi.org/10.1016/0047-6374\(92\)90084-q](https://doi.org/10.1016/0047-6374(92)90084-q)
52. Mori K, Blackshear PE, Lobenhofer EK, Parker JS, Orzech DP, Roycroft JH, Walker KL, Johnson KA, Marsh TA, Irwin RD, Boorman GA (2007) Hepatic Transcript Levels for Genes Coding for Enzymes Associated with Xenobiotic Metabolism are Altered with Age. *Toxicol Pathol* 35: 242–251.
<https://doi.org/10.1080/01926230601156286>
53. Kumar D, Rizvi SI (2014) A critical period in lifespan of male rats coincides with increased oxidative stress. *Arch Gerontol Geriatr* 58(3): 427–433.
<https://doi.org/10.1016/j.archger.2013.11.006>
54. Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Poljak A, Grant R (2011) Age Related Changes in NAD⁺ Metabolism Oxidative Stress and Sirt1 Activity in Wistar Rats. *PLoS One* 6(4): e19194.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019194>
55. Nakamura TJ, Nakamura W, Tokuda IT, Ishikawa T, Kudo T, Colwell CS, Block GD (2015) Age-Related Changes in the Circadian System Unmasked by Constant Conditions. *ENEURO* 2(4): 0064–15.2015.
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0064-15.2015>

Prolonged Light Deprivation Modulates the Age-Related Changes in α -Tocopherol Level in Rats

I. V. Baishnikova^{a, *}, T. N. Ilyina^a, E. A. Khizhkin^a, and V. A. Ilyukha^a

^a*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Petrozavodsk, Russia*

^{*}*e-mail: iravbai@mail.ru*

The light-dark cycle is one of the main environmental factors affecting the rhythm of biological processes in the body. A change or absence of this cyclicity leads to disruption of circadian rhythms and negatively affects the functioning of all body systems. The aim of the study was to investigate the effect of constant darkness, which began from the prenatal period (DD/DD) or from the moment of birth (LD/DD) and continued throughout life, on the content of α -tocopherol in Wistar rats in late ontogenesis (3, 6, 12, 18 and 24 months). Control animals were kept under standard light conditions (LD). The level of α -tocopherol was determined by HPLC. The modulating effect of long-term light deprivation was found in the liver, skeletal muscle and lungs, most of the changes were observed in 12-month-old rats. Thus, in the liver the level of vitamin decreased in both experimental groups, which is probably due to the regulatory role of the organ in maintaining vitamin E homeostasis in the body. In the skeletal muscle of rats from the DD/DD group, a significant increase in the content of α -tocopherol was found. This may show the accumulation of lipids in myocytes as a result of disorder of homeostasis of the main energy substrates of skeletal muscles. In 24-month-old rats of this group, the vitamin level in the tissue was significantly lower than in the control, which may indicate a decrease in the antioxidant protection of the skeletal muscle due to age-related changes. In rats, exposed to constant darkness after birth, there were differences in the direction of changes in the lungs α -tocopherol level compared with the control group at the age of 6 and 12 months. In aging and old animals, the effect of light deprivation was probably smoothed out by age-related disturbances of the circadian system thus in most of the studied tissues the vitamin content did not differ in rats of the control and both experimental groups. The results can be useful in assessing the physiological state of people working or living under poor lighting conditions.

Keywords: α -tocopherol, aging, light deprivation, postnatal ontogeny, Wistar rats

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОИЗВОЛЬНЫХ ДВИЖЕНИЙ В УСЛОВИЯХ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ НЕПРОИЗВОЛЬНОГО ВНИМАНИЯ

© 2022 г. В. М. Князева¹, *, А. М. Плакхин¹, А. А. Александров¹¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: v.m.knyazeva@spbu.ru

Поступила в редакцию 14.07.2022 г.

После доработки 12.08.2022 г.

Принята к публикации 23.08.2022 г.

В работе исследовалось влияние процессов, сопряженных с активацией системы автоматического обнаружения изменений в слуховой среде и переключения внимания, на вызванные потенциалы, связанные с подготовкой и реализацией произвольного движения. Во время эксперимента испытуемые производили самоинициированные нажатия на клавишу указательным пальцем правой руки одновременно с прослушиванием двух типов стимульных последовательностей: парадигма одд-болл и контрольная парадигма. Испытуемых просили сосредоточить внимание на моторном задании и игнорировать звуковые стимулы. Парадигма одд-болл представляла собой последовательность повторяющихся (стандартных) и отклоняющихся (девиантных) стимулов, предъявление которых приводит к активации системы произвольного внимания. Анализ распределения числа нажатий относительно времени подачи звукового стимула показал, что в парадигме одд-болл достоверно увеличивается число нажатий, совершенных на интервале 800–1200 мс после предъявления стимула по сравнению с интервалом, который соответствует моменту предъявления стимула (0–400 мс). При анализе потенциала готовности было обнаружено значительное увеличение амплитуды билатерально симметрично распределенного компонента на интервале от –300 до –600 мс до начала движения, совершаемого одновременно с прослушиванием стимулов в парадигме одд-болл по сравнению с контрольной парадигмой. Полученные результаты позволяют говорить об активирующем эффекте процессов, связанных с вовлечением системы произвольного внимания, на ранние компоненты подготовки движения.

Ключевые слова: потенциал готовности, произвольные движения, негативность рассогласования, произвольное внимание, парадигма одд-болл

DOI: 10.31857/S0869813922100090

Регистрация электроэнцефалограммы в момент подготовки и совершения произвольного движения позволяет установить, что указанные процессы сопровождаются формированием медленного отрицательного потенциала, известного как потенциал готовности (ПГ). В последнее время интенсивно разрабатываются интерфейсы “мозг–компьютер”, основанные на классификации паттернов ПГ, что определяет необходимость исследования нейрофизиологических механизмов этого процесса, а также поиска новых подходов к улучшению распознавания потенциалов в реальном времени [1].

ПГ имеет преимущественно центральное распределение и может быть зарегистрирован за несколько секунд до совершения движения. В среднем за 300–500 мс

до начала движения наблюдается резкое увеличение негативности сигнала, которое выделяют в отдельный компонент — поздний ПГ [2, 3]. Поздний ПГ имеет асимметричное распределение с максимумом над контралатеральными областями моторной коры (для движений руки) [4].

Наиболее вероятным источником позднего ПГ является контралатеральная моторная кора (поля 3 и 4 по Бродману), однако корковые генераторы раннего ПГ остаются предметом для дискуссий [5]. Ряд авторов полагает, что в случае движений руки основными генераторами раннего ПГ являются билатеральная дополнительная и пре-дополнительная моторная области (поле 6) и цингулярная моторная кора [6]. С другой стороны, результаты построения источников активности показывают, что наилучший результат обнаруживается при моделировании генератора раннего ПГ в билатеральной моторной коре с минимальным вкладом дополнительной моторной области в генерацию сигнала [7]. Исследования с применением функциональной магнитно-резонансной томографии показали, что большинство испытуемых демонстрируют активацию в области дополнительной моторной коры, в то время как у части испытуемых также наблюдается активация контралатеральной моторной коры за 1 с до начала движения [8]. Таким образом, все гипотезы относительно корковых генераторов раннего ПГ можно разделить на три группы: источником ПГ является только билатеральная дополнительная моторная область, только моторная кора или же имеет место совместная активация этих двух областей [5].

Время возникновения, амплитуда и топографическое распределение ранней и поздней составляющих ПГ зависят от вида движения, его темпа, скорости, силы, точности и сложности моторного ответа, а также от тренировки, обучения, готовности совершить движение и некоторых других параметров [9]. На ранний ПГ влияют такие когнитивные факторы, как степень нисходящего контроля со стороны ЦНС, необходимость планирования и выбора движения, тогда как на поздний ПГ больше влияют факторы, связанные с самим движением, такие как точность, дискретность и сложность. Это согласуется с вероятной локализацией генераторов двух компонент ПГ: билатеральная премоторная кора и латеральная премоторная кора для раннего ПГ и контралатеральная прецентральная кора для позднего ПГ. Однако точная связь каждого компонента с намерением совершить движение остается до конца не исследованной [10].

В известном эксперименте, проведенном исследовательской группой под руководством Libet [11], была произведена оценка времени возникновения сознательного желания совершить движение относительно времени начала ПГ. После совершения простого движения, такого как поднятие пальца, участников эксперимента просили сообщить, где находилась вращающаяся точка на циферблате в тот момент, когда они впервые осознали желание двигаться. Было обнаружено, что ПГ начинается примерно за 1.5–2.0 с до фактического возникновения намерения действовать, таким образом, показывая, что подготовка движения начинается раньше, чем это осознается человеком.

Представленная интерпретация эксперимента Libet не является единственной. Согласно так называемой стохастической модели принятия решения [12, 13] при отсутствии побуждающих команд точный момент принятия решения о совершении движения определяется случайными колебаниями активности нейронов (которым соответствует ранний ПГ). Эти спонтанные колебания приводят к превышению порогового значения группой нейронов, ответственных за определенное действие (поздний ПГ), что сопровождается субъективным принятием решения о совершении движения.

Теория сэмплирования медленных потенциалов коры основывается на аналогичном предположении [14]. В течение негативной фазы постоянных спонтанных

колебаний корковой активности, возникающих с частотой менее 1 Гц, происходит повышение возбудимости нейронных сетей, связанных с инициацией движения. Во время этих флуктуаций переживается неспецифическое желание совершить движение, что приводит к повышению вероятности спонтанного произвольного движения во время негативной фазы/негативного пика этих флуктуаций.

Кроме этого, существует также теория, что ПГ, формирующийся при совершении произвольных движений, идентичен условной негативной волне и является коррелятом процесса ожидания [15]. С другой стороны, существуют данные о том, что условная негативная волна является комбинацией ПГ и отдельного, связанного с ожиданием, компонента [16]. Также было высказано предположение, что условная негативная волна и негативность, связанная с ожиданием стимула, могут быть связаны с вниманием и иметь общие нервные генераторы в теменной области, но различаться в лобных областях [17]

Таким образом, вопрос о связи ПГ и других медленноволновых потенциалов остается открытым. Также до сих пор точно неизвестно, какие компоненты ПГ, кроме латерализованного ПГ, действительно связаны с подготовкой движения [18] и является ли ранний ПГ нейронным коррелятом планирования или подготовки моторного акта, сознательного намерения совершить движение, их комбинации или ни одного из вышеперечисленного [10, 13]. В связи с этим представляет интерес изучить зависимость между ПГ и процессами внимания, оказывающими активизирующее действие на процессы подготовки движения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В эксперименте приняли участие 14 человек (из них 5 мужчин; средний возраст 24 ± 4 лет). Все испытуемые были правшами и сообщили об отсутствии неврологических заболеваний, нормальном слухе и нормальном или скорректированном зрении. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Экспериментальные процедуры были одобрены Этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного университета.

Во время эксперимента испытуемые производили произвольные самоиницированные нажатия на клавишу указательным пальцем правой руки. Испытуемых просили избегать ритмических движений, варьировать время между нажатиями и совершать нажатие достаточное количество раз для набора статистики (точная цифра не оговаривалась). Во время эксперимента через головные телефоны предъявлялись последовательности звуковых стимулов, которые испытуемых просили игнорировать. Каждому участнику в случайном порядке без перерыва предъявлялись два типа стимульных последовательностей: парадигма одд-болл и контрольная парадигма. Парадигма одд-болл состояла из двух типов стимулов, проигрываемых в псевдослучайном порядке: звуковой тон частотой 1000 Гц и вероятностью предъявления 85% (стандартный стимул) и звуковой тон частотой 1200 Гц и вероятностью предъявления 15% (девиантный стимул). Возникновение отклоняющихся (девиантных) стимулов в последовательности повторяющихся стандартных приводит к активации системы непроизвольного внимания, что отражается в генерации негативности рассогласования в вызванных потенциалах. Контрольная парадигма состояла только из стимулов частотой 1000 Гц. В каждой парадигме предъявлялась 1000 стимулов. Длительность стимула составляла 50 мс (время нарастания и спада 5 мс), интенсивность – 60 дБ, межстимульный интервал варьировал от 800 до 900 мс.

Для создания и предъявления стимулов использовалась программа “Presentation” (Neurobehavioral Systems, США).

У каждого испытуемого в обеих парадигмах рассчитывалось общее количество нажатий, а также проводился кросскорреляционный анализ моментов нажатий и времени предъявления девиантных и контрольных стимулов. Для того, чтобы число взятых в анализ контрольных стимулов было равно числу девиантных стимулов, из всех стимулов, предъявляемых в контрольной парадигме были взяты в анализ 150 стимулов, совпадающих с девиантными стимулами по времени предъявления в последовательности. Число нажатий, совершенных относительно времени подачи звукового стимула на интервале от -400 до 1600 мс с шагом 400 мс было рассчитано с использованием алгоритма, входящего в пакет MLIB [19] для среды MATLAB (MathWorks, США).

Регистрация электроэнцефалограммы проводилась при помощи хлорсеребряных электродов, размещенных в отведениях: F3, Fz, F4, C3, Cz, C4, Pz согласно международной системе 10–20. Референтный электрод находился на кончике носа, заземляющий – на лбу. Электроокулограмма регистрировалась при помощи электрода, расположенного около височного угла левого глаза. Сопротивление электродов не превышало 5 кОм. Для регистрации ЭЭГ использовался цифровой электроэнцефалограф Мицар-ЭЭГ-05/70-202 совместно с пакетом программного обеспечения для регистрации и обработки электроэнцефалограммы WinEEG (ООО Мицар, Россия).

Для анализа ПГ были взяты данные 10 испытуемых (из них 2 мужчин; средний возраст 23 ± 3 лет), совершивших более 30 нажатий (среднее число нажатий 87). ЭЭГ сигнал был отфильтрован в полосе 0.032 – 40 Гц. Продолжительность анализируемой эпохи составляла 3000 мс. Для коррекции изолинии использовался интервал от 2800 до 2000 мс до начала нажатия. Пробы, амплитуда сигнала в которых превышала по амплитуде ± 100 мкВ на любом из каналов были удалены из анализа.

Все данные имели нормальное распределение согласно критерию Колмогорова–Смиронова. Статистический анализ среднего количества нажатий и количества нажатий, совершенных относительно времени подачи звукового стимула, проводился с использованием непараметрического критерия Уилкоксона. Анализ амплитуды потенциала готовности проводился с использованием дисперсионного анализа с повторными измерениями (IBM SPSS Statistic v. 21, IBM Corporation, Нью-Йорк, США) на интервалах от -1200 до 0 мс с шагом 300 мс с внутригрупповыми факторами “Парадигма” (парадигма одд-болл/контрольная парадигма), “Фронтальность” (фронтальные/центральные отведения) и “Латерализация” (левое полушарие/медианные отведения/правое полушарие). В случае значимого отклонения от предположения о сферичности, оцениваемого с помощью критерия Моучли, применялась поправка статистики F-критерия по методу Гринхауса–Гейссера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поведенческие данные

Среднее количество нажатий, совершенное испытуемыми в парадигме одд-болл было на 27% больше ($M = 85$, $SD = 64$), чем в контрольной парадигме ($M = 73$, $SD = 53$), однако статистический анализ с помощью критерия Уилкоксона показал только маргинально достоверные отличия между полученными значениями ($p = 0.06$). Следует отметить, что полученные данные имеют значительную разницу между испытуемыми: максимальное число нажатий оставило 316 (165 – в парадигме одд-болл и 151 – в парадигме контроль), а минимальное – 22 (11 – в парадигме одд-болл и 11 – в парадигме контроль).

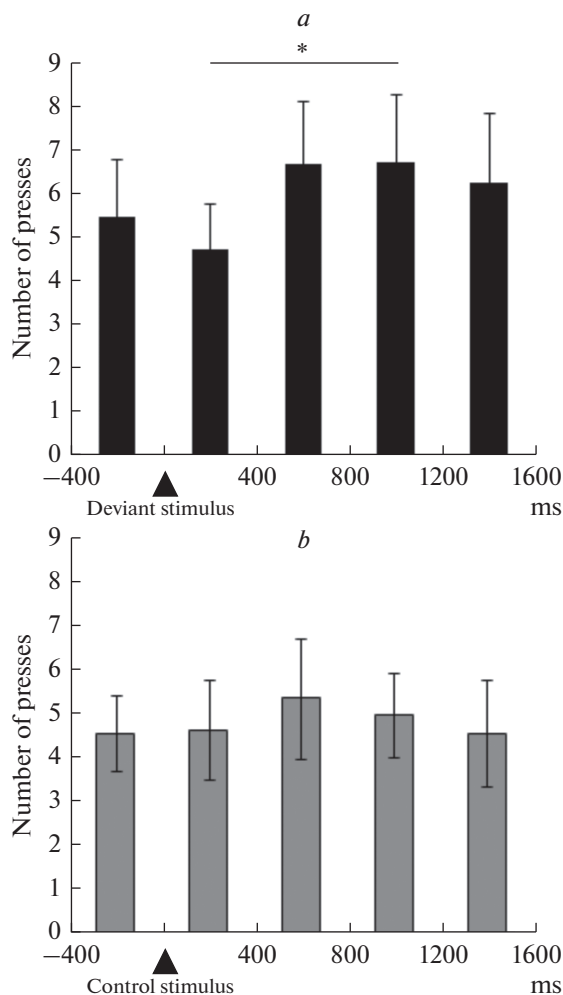


Рис. 1. Распределение среднего числа нажатий (\pm ошибка среднего) относительно времени подачи девиантного и контрольного стимула на интервале от -400 до 1600 мс с шагом 400 мс в парадигме одд-болл (*a*) и контрольной парадигме (*b*). Момент предъявления стимула обозначен стрелкой. * – $p < 0.05$ по результатам статистического анализа с помощью критерия Уилкоксона.

На рис. 1 представлено распределение числа нажатий относительно времени подачи звукового стимула на интервале от -400 до 1600 мс с шагом 400 мс. Было проведено сравнение суммарного количества нажатий, совершенных на указанном интервале с помощью непараметрического критерия Уилкоксона. Обнаружено достоверное увеличение числа нажатий на интервале $800-1200$ мс после предъявления девиантного стимула по сравнению с интервалом $0-400$ мс ($p = 0.015$) в парадигме одд-болл. В контрольной парадигме достоверных отличий обнаружено не было.

Потенциал готовности

Для анализа ПГ были взяты данные 10 испытуемых, совершивших более 30 нажатий (среднее число нажатий 87). Визуальный анализ данных показал наличие

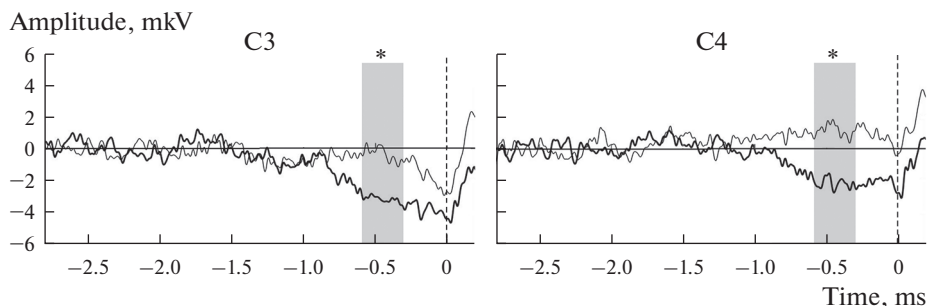


Рис. 2. Потенциал готовности, зарегистрированный в центральных отведениях в парадигме одд-болл (черная линия) и контрольной парадигме (серая линия). Момент совершения нажатия показан вертикальной пунктирной линией. Серым прямоугольником выделен интервал -300 до -600 мс. * $-p < 0.05$ по результатам дисперсионного анализа с повторными измерениями.

медленно нарастающей негативности, начинающейся примерно за 1000 мс до начала движения в центральных отведениях, которую мы определили как ПГ. На рис. 2 представлен ПГ, зарегистрированный в центральных отведениях в парадигме одд-болл и контрольной парадигме. В табл. 1 представлены средние значения амплитуды ПГ на интервалах от -1200 до 0 мс с шагом 300 мс.

Дисперсионный анализ показал достоверное влияние факторов “Фронтальность” ($F(9,1) = 5.380, p = 0.046, \eta^2 = 0.374$) и “Латерализация” ($F(9,1) = 7.163, p = 0.019, \eta^2 = 0.443$) на интервале от -300 до 0 мс до начала движения. На указанном интервале наблюдается увеличение негативности сигнала в центральных отведениях и в левом полушарии.

На интервале от -600 до -300 мс было обнаружено достоверное влияние факторов “Парадигма” ($F(9,1) = 8.586, p = 0.017, \eta^2 = 0.488$), а также пограничное к значению $p < 0.05$ взаимодействие факторов “Парадигма” \times “Фронтальность” ($F(9,1) = 3.726, p = 0.086, \eta^2 = 0.293$). Апостериорный анализ парных сравнений показал достоверное увеличение негативности ответа в парадигме одд-болл по сравнению с контрольной парадигмой как в центральных ($p = 0.044$), так и во фронтальных отведениях ($p = 0.016$). В парадигме одд-болл наблюдалась достоверно более негативная амплитуда вызванных потенциалов (ВП) во фронтальных отведениях чем в центральных ($p = 0.033$), в то время как в контрольной парадигме эти различия не достигают уровня статистической значимости ($p = 0.171$).

На интервалах от -900 до -600 мс и от -1200 до -900 мс до начала движения достоверных влияний факторов или взаимодействия факторов обнаружено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе изучалось влияние активации процессов непроизвольного внимания, связанных с генерацией негативности рассогласования, на ВП, сопровождающие подготовку и совершение произвольного движения.

Мы обнаружили, что при совершении произвольных движений в парадигме одд-болл наблюдается некоторое увеличение числа нажатий по сравнению с контрольной парадигмой, однако не достигающее уровня статистической значимости. Анализ распределения числа нажатий относительно времени подачи звукового стимула показал, что в парадигме одд-болл число нажатий, совершенных на интервале 800–1200 мс после предъявления стимула достоверно больше по сравнению с интервалом, соответствующим моменту предъявления стимула (0–400 мс). Полу-

Таблица 1. Средние значения (M , мкВ) и значения стандартной ошибки среднего (SEM) амплитуды потенциала готовности

Парадигма		Отведение					
		F3	Fz	F4	C3	Cz	C4
от –300 до 0 мс							
Контрольная парадигма	M	–0.80	0.22	2.76	–1.62	–1.05	0.84
	SEM	1.90	1.97	2.43	1.56	1.89	1.69
Парадигма одд-болл	M	–3.66	–3.90	–2.74	–3.81	–3.17	–2.16
	SEM	1.24	1.04	1.01	0.79	0.67	0.70
от –600 до –300 мс							
Контрольная парадигма	M	–0.24	0.81	3.11	–0.36	–0.32	1.13
	SEM	1.50	1.69	2.48	1.26	1.68	1.51
Парадигма одд-болл	M	–3.83	–4.02	–2.82	–3.19	–2.79	–2.17
	SEM	0.91	0.75	0.61	0.57	0.53	0.57
от –900 до –600 мс							
Контрольная парадигма	M	–0.58	0.38	2.62	–0.41	–0.38	0.89
	SEM	1.48	1.52	2.31	1.28	1.57	1.37
Парадигма одд-болл	M	–2.26	–2.44	–1.75	–1.63	–1.25	–1.01
	SEM	0.66	0.51	0.45	0.30	0.38	0.37
от –1200 до –900 мс							
Контрольная парадигма	M	–1.31	–0.11	2.07	–0.87	–0.55	0.56
	SEM	1.07	1.06	1.81	0.88	1.08	0.88
Парадигма одд-болл	M	–0.88	–1.05	–0.06	–0.94	–0.37	–0.19
	SEM	0.74	0.62	0.96	0.44	0.43	0.44

ченные данные позволяют говорить о наличии неравномерности в распределении числа нажатий в парадигме одд-болл по сравнению с контрольной парадигмой.

В парадигме одд-болл при различии физических характеристик в последовательно предъявляемых стимулах генерируется так называемая негативность рассогласования – компонент ВП отражающий процессы непроизвольного переключения внимания [20, 21]. Отмечают, что активация системы автоматического обнаружения изменений в слуховой среде и переключения внимания может оказывать стимулирующее действие и приводить к снижению времени реакции и количества ошибок при ответе на стимул [22, 23], а также уменьшать скорость развития мышечного утомления [24, 25]. Мы предполагаем, что процессы, связанные с генерацией негативности рассогласования, также могут оказывать активирующее влияние на процесс подготовки произвольного самоиницированного движения.

Согласно стохастической модели принятия решения и теории сэмплирования медленных потенциалов коры в отсутствие сильного волевого сигнала выбор точного момента начала самоиницированного движения определяется моментом превышения некоторого порогового уровня активности группой нейронов интеграторов [12–14]. Рост числа нажатий после предъявления девиантного стимула может быть следствием неспецифического активирующего влияния со стороны систем внимания, усиливающих свою активность после генерации негативности рассогласования.

Данные регистрации ПГ также показывают значительное увеличение амплитуды ВП в парадигме одд-болл на интервале от -600 до -300 мс до начала движения. Следует отметить, что на этом интервале ПГ является билатерально симметричным, что выражается в отсутствие достоверного влияния фактора “Латерализация” на указанном интервале. На более позднем интервале от -300 до 0 мс наблюдается достоверная разница между амплитудой ответа для правого и левого полушария, в то время как увеличение амплитуды ПГ в парадигме одд-болл не достигает уровня статистической значимости.

Согласно литературным данным, при выполнении простых самопроизвольных движений в медленном темпе ранний ПГ начинает развиваться билатерально примерно за 2 с до начала движения в пре-дополнительной моторной области (pre-SMA) и в собственно дополнительной моторной области (SMA), а вскоре после этого в латеральной премоторной коре. Примерно за 400 мс до начала движения в контралатеральной моторной коре и латеральной премоторной коре возникает еще один более крутой отрицательный наклон (поздний ПГ) [10, 26]. Таким образом, обнаруженное в парадигме одд-болл достоверное увеличение амплитуды ПГ на интервале от -600 до -300 мс соответствует билатерально симметричному ПГ, генерируемому предположительно в дополнительной моторной области и латеральной премоторной коре.

Установлено, что субъективное отношение испытуемого к стимулу, например, сосредоточение или отвлечение внимания, меняет распределение и параметры ВП. Предыдущие исследования показали, что выполнение сложных комплексных действий, требующих соответственно большего объема внимания, приводит к увеличению амплитуды позднего ПГ [27–29]. В работе Keller и Heckhausen [30] было проведено сравнение ПГ при совершении произвольных движений в классической парадигме Libet и непроизвольных движений. Было установлено, что и произвольные, и непроизвольные движения вызывают ПГ, однако при совершении произвольных движений ПГ достоверно более выражен. Более того, авторы установили различия в распределении потенциала: при совершении непроизвольных движений активация наблюдалась преимущественно в контралатеральных областях моторной коры, в то время как при совершении произвольных движений были задействованы области дополнительной моторной коры. Аналогичный результат был получен в ряде других работ [31, 32], где было показано, что внимание (и, предположительно, осознание намерения действовать) приводит к увеличению амплитуды ПГ, зарегистрированного над медиальными лобно-центрльными областями в течение 500 мс до начала движения.

Можно предположить, что полученное в нашем исследовании увеличение амплитуды ПГ является результатом повышения концентрации произвольного внимания на текущей моторной задаче, которое необходимо для преодоления постоянного рефлекторного отвлечения внимания девиантными стимулами. Кроме того, следует отметить, что одновременно с увеличением ПГ в одд-болл парадигме наблюдается смещение максимума амплитуды ВП к фронтальным отведениям, что может говорить о большем вкладе дополнительной моторной области в генерацию потенциала. Таким образом, повышение внимания к задаче ожидаемо вызывает повышение активации центральной нервной системы, что приводит к усилению активности областей коры, отвечающих за подготовку движения [33].

Полученные данные также согласуются с результатами ряда исследований условной негативной волны вызванных потенциалов мозга человека [34, 35], что может говорить о сходных нейронных процессах, лежащих в основе генерации этих медленных потенциалов. Недавние исследования [36] также подтверждают эту гипотезу, демонстрируя влияние системы внимания на условно-негативной

волне, приводящее к усилению нейронной активности в области дополнительной моторной коры.

Следует отметить, что мониторинг и классификация паттернов ПГ в режиме реального времени является одним из перспективных направлений для разработки интерфейсов мозг—компьютер [1, 37]. Полученные в нашем исследовании результаты по усилению выраженности ПГ в условиях активации системы внимания в парадигме одд-болл могут найти применение в такого рода исследованиях как одного из возможных механизмов улучшения качества различения одиночных ВП.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом СПбГУ, ID 91924061.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кирой В, Лазуренко Д, Шепелев И, Асланян Е, Миняева Н, Бахтин О* (2017) Нейротехнологии: нейро-БОС и интерфейс “мозг – компьютер”. Изд-во Южн федерал универ. Ростов-на-Дону. [*Kiroy V, Lazurenko D, Shepelev I, Aslanyan E, Minyaeva N, Bakhtin O* (2017) Neurotechnologies: neuro-BFB and brain-computer interface. Southern Federal Univ Press. Rostov-on-Don. (In Russ)].
2. *Deecke L, Grozinger B, Kornhuber HH* (1976) Voluntary finger movement in man: Cerebral potentials and theory. *Biol Cybern* 23: 99–119. <https://doi.org/10.1007/BF00336013>
3. *Shibasaki H, Barrett G, Halliday E, Halliday A* (1980) Components of the movement-related cortical potential and their scalp topography. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 49: 213–226. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(80\)90216-3](https://doi.org/10.1016/0013-4694(80)90216-3)
4. *Shibasaki H, Barrett G, Halliday E, Halliday AM* (1981) Cortical potentials associated with voluntary foot movement in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 52: 507–516. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(81\)91426-7](https://doi.org/10.1016/0013-4694(81)91426-7)
5. *MacKinnon CD* (2003) Recordings of Movement-Related Potentials Combined with PET, fMRI of MEG. In: *Jahanshahi M, Hallett M* (eds) *The Bereitschaftspotential*. Springer New York 95–111.
6. *Deecke L, Kornhuber HH* (2003) Human Freedom, Reasoned Will, and the Brain: The Bereitschaftspotential Story. In: *Jahanshahi M, Hallett M* (eds) *The Bereitschaftspotential*. Springer New York 283–320.
7. *Botzel K, Paulus W, Scherg M* (1993) Bereitschaftspotential: is there a contribution of the supplementary motor area? *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Evoked Potentials* 89: 187–196. [https://doi.org/10.1016/0168-5597\(93\)90132-9](https://doi.org/10.1016/0168-5597(93)90132-9)
8. *Ball T, Schreiber A, Feige B, Wagner M, Lecking CH, Kristeva-Feige R* (1999) The role of higher-order motor areas in voluntary movement as revealed by high-resolution EEG and fMRI. *Neuroimage* 10: 682–694. <https://doi.org/10.1006/nimg.1999.0507>
9. *Lang W* (2003) Surface Recordings of the Bereitschaftspotential in Normals. In: *Jahanshahi M, Hallett M* (eds) *The Bereitschaftspotential*. Springer New York 19–34.
10. *Shibasaki H, Hallett M* (2006) What is the Bereitschaftspotential? *Clin Neurophysiol* 117: 2341–2356. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2006.04.025>
11. *Libet B, Gleason CA, Wright EW, Pearl DK* (1983) Time of conscious intention to act in relation to onset of cerebral activity (readiness-potential): The unconscious initiation of a freely volun-

- tary act. *Brain* 106: 623–642.
<https://doi.org/10.1093/brain/106.3.623>
12. *Schurger A, Mylopoulos M, Rosenthal D* (2016) Neural Antecedents of Spontaneous Voluntary Movement: A New Perspective. *Trends Cogn Sci* 20: 77–79.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2015.11.003>
 13. *Schurger A, Sitt JD, Dehaene S* (2012) An accumulator model for spontaneous neural activity prior to self-initiated movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2904–E2913.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1210467109>
 14. *Schmidt S, Jo HG, Wittmann M, Hinterberger T* (2016) “Catching the waves” – slow cortical potentials as moderator of voluntary action. *Neurosci Biobehav Rev* 68: 639–650.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.023>
 15. *Schlegel A, Alexander P, Sinnott-Armstrong W, Roskies A, Tse PU, Wheatley T* (2013) Barking up the wrong tree: Readiness potentials reflect processes independent of conscious will. *Exp Brain Res* 229: 329–335.
<https://doi.org/10.1007/s00221-013-3479-3>
 16. *Damen EJP, Brunia CHM* (1987) Changes in Heart Rate and Slow Brain Potentials Related to Motor Preparation and Stimulus Anticipation in a Time Estimation Task. *Psychophysiology* 24: 700–713.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.1987.tb00353.x>
 17. *Kotani Y, Ohgami Y, Arai J, Kiryu S, Inoue Y* (2011) Motor and nonmotor components of event-related brain potential in preparation of motor response. *J Behav Brain Sci* 1: 234–241.
<https://doi.org/10.4236/jbbs.2011.14030>
 18. *Schurger A, Hu P, Ben, Pak J, Roskies AL* (2021) What Is the Readiness Potential? *Trends Cogn Sci* 25: 558–570.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2021.04.001>
 19. *Stüttgen M* (2022) MLIB – toolbox for analyzing spike data.
<https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/37339-mlib-toolbox-for-analyzing-spike-data>
 20. *Näätänen R, Gaillard AWK, Mäntysalo S* (1978) Early selective-attention effect on evoked potential reinterpreted. *Acta Psychol (Amst)* 42: 313–329.
[https://doi.org/10.1016/0001-6918\(78\)90006-9](https://doi.org/10.1016/0001-6918(78)90006-9)
 21. *Näätänen R, Astikainen P, Ruusuvirta T, Huotilainen M* (2010) Automatic auditory intelligence: An expression of the sensory-cognitive core of cognitive processes. *Brain Res Rev* 64: 123–136.
 22. *Aleksandrov AA, Babanin ME, Stankevich LN* (2003) Mechanisms of Generation of Mismatch Negativity and Their Role in the Recognition of Brief Auditory Stimuli. *Neurosci Behav Physiol* 33: 867–872.
<https://doi.org/10.1023/A:1025992620828>
 23. *Aleksandrov AA, Starostina LV, Stankevich LN* (2005) Characteristics of evoked potentials of the human brain during recognition of short acoustic stimuli of different frequencies. *Neurosci Behav Physiol* 35: 209–213.
<https://doi.org/10.1007/s11055-005-0015-3>
 24. *Aleksandrov AA, Knyazeva VM* (2017) Effects of Cognitive Loading on the Development of Muscle Fatigue. *Neurosci Behav Physiol* 47: 960–966.
<https://doi.org/10.1007/s11055-017-0497-9>
 25. *Aleksandrov AA, Knyazeva VM, Stankevich LN, Dmitrieva ES, Shestakova AN* (2016) Mismatch negativity affects muscle fatigue during repeated contraction trials of different durations. *Front Physiol* 7: 13.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00013>
 26. *Di Russo F, Berchicci M, Bozzacchi C, Perri RL, Pitzalis S, Spinelli D* (2017) Beyond the “Bereitschaftspotential”: Action preparation behind cognitive functions. *Neurosci Biobehav Rev* 78: 57–81.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.019>
 27. *Simonetta M, Clanet M, Rascol O* (1991) Bereitschaftspotential in a simple movement or in a motor sequence starting with the same simple movement. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Evoked Potentials* 81: 129–134.
[https://doi.org/10.1016/0168-5597\(91\)90006-J](https://doi.org/10.1016/0168-5597(91)90006-J)
 28. *Kitamura JI, Shibasaki H, Takagi A, Nabeshima H, Yamaguchi A* (1993) Enhanced negative slope of cortical potentials before sequential as compared with simultaneous extensions of two fingers. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 86: 176–182.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(93\)90005-G](https://doi.org/10.1016/0013-4694(93)90005-G)
 29. *Masaki H, Takasawa N, Yamazaki K* (1998) Enhanced negative slope of the readiness potential preceding a target force production task. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol – Evoked Potentials* 108: 390–397.
[https://doi.org/10.1016/S0168-5597\(98\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S0168-5597(98)00019-7)

30. Keller I, Heckhausen H (1990) Readiness potentials preceding spontaneous motor acts: voluntary vs. involuntary control. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 76: 351–361. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(90\)90036-J](https://doi.org/10.1016/0013-4694(90)90036-J)
31. Takashima S, Cravo AM, Sameshima K, Ramos RT (2018) The effect of conscious intention to act on the Bereitschaftspotential. *Exp Brain Res* 236: 2287–2297. <https://doi.org/10.1007/s00221-018-5302-7>
32. Takashima S, Najman FA, Ramos RT (2019) Disruption of volitional control in obsessive-compulsive disorder: Evidence from the Bereitschaftspotential. *Psychiatry Res – Neuroimaging* 290: 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2019.06.007>
33. Freude G, Ullsperger P, Kruger H, Pietschmann M (1988) Bereitschaftspotential in preparation to mental activities international. *J Psychophysiol* 6: 291–297. [https://doi.org/10.1016/0167-8760\(88\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0167-8760(88)90016-5)
34. Birbaumer N, Elbert T, Lutzenberger W, Rockstroh B, Schwab J (1981) EEG and slow cortical potentials in anticipation of mental tasks with different hemispheric involvement. *Biol Psychol* 13: 251–260. [https://doi.org/10.1016/0301-0511\(81\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0301-0511(81)90040-5)
35. Simons RF, Ohman A, Lang PJ (1979) Anticipation and Response Set: Cortical, Cardiac, and Electrodermal Correlates. *Psychophysiology* 16: 222–233. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.1979.tb02982.x>
36. Liu Y, Zhang D, Ma J, Li D, Yin H, Luo Y (2013) The attention modulation on timing: an event-related potential study. *PLoS One* 8: e66190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066190>
37. Волкова КВ, Дагаев НИ, Киселев АС, Касумов ВР, Александров МВ, Осадчий АЕ (2017) Интерфейс мозг-компьютер: опыт построения, использования и возможные пути повышения рабочих характеристик, Журн высш нервн деятельн им ИП Павлова 67: 504–520. [Volkova KV, Dagaev NI, Kiselev AS, Kasumov VR, Aleksandrov MV, Osadchiy AE (2017) Brain-computer interface: experience in building, using and possible ways to improve performance, *J Higher Nerv Activity named after IP Pavlova* 67: 504–520. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7868/s0044467717040128>

Voluntary Movements Performance during the Involuntary Attention Activation

V. M. Knyazeva^{a, *}, A. M. Plakchin^a, and A. A. Aleksandrov^a

^a Saint Petersburg State University, St Petersburg, Russia

*e-mail: v.m.knyazeva@spbu.ru

The present experiment was aimed to study the influence of automatic change detection and attention switching processes on event related potentials associated with the preparation of voluntary movement. Participants performed self-initiated key presses with their right hand index finger simultaneously with listening to sound stimuli presented in two sequences: the oddball paradigm and the control paradigm. Participants were asked to focus on the motor task and ignore the sound stimuli. The oddball paradigm is a sequence of repetitive (standard) and deviant tones, which leads to the involuntary attention activation. The distribution analysis of the number of movements relative to the time of sound stimulus presentation showed that in the oddball paradigm, the number of pressings performed in the interval of 800–1200 ms after the stimulus was significantly greater compared to the interval of stimulus presentation (0–400 ms). When analyzing the readiness potential amplitude, a significant increase of the bilaterally symmetrical component in the interval from –300 to –600 ms before the movement was found in the oddball paradigm compared to the control paradigm. The results obtained allow us to speak about the activating effect of the processes associated with the involuntary attention system on the early components of movement preparation.

Keywords: readiness potential, Bereitschaftspotential, voluntary movements, mismatch negativity, involuntary attention, oddball paradigm

**РЕГИСТРАЦИЯ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОФАМИНА
В ПРИЛЕЖАЩЕМ ЯДРЕ МЕТОДОМ БЫСТРОСКАНИРУЮЩЕЙ
ЦИКЛИЧЕСКОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЗОНЫ
ВЕНТРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ПОКРЫШКИ, РАЗДРАЖЕНИЕ КОТОРОЙ
ВЫЗЫВАЕТ И РЕАКЦИЮ САМОСТИМУЛЯЦИИ**

© 2022 г. С. С. Пюрвеев^{1, 2}, В. В. Сизов¹, А. А. Лебедев^{1, *}, Е. Р. Бычков¹,
В. Н. Мухин¹, А. В. Дробленков¹, П. Д. Шабанов¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

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

Поступила в редакцию 01.06.2022 г.

После доработки 11.08.2022 г.

Принята к публикации 23.08.2022 г.

Целью работы было установление возможности использования метода циклической вольтамперометрии с быстрым сканированием (FSCV) для регистрации выброса дофамина в прилежащем ядре в ответ на электрическую стимуляцию той зоны вентральной области покрышки (VTA) электродом, которая используется для изучения реакции самостимуляции у крыс. Методом FSCV *in vivo* проводили регистрацию высвобождения дофамина в прилежащем ядре в ответ на электрическую стимуляцию VTA, а далее на этих животных вырабатывали реакцию самостимуляции при раздражении тех же зон VTA. У наркотизированных животных производили стимуляцию (240 мкА) пачкой импульсов (100 Гц), длительностью 0.5 с через каждые 3 мин в течение 1 ч, затем вводили внутривенно фенамин в дозе 1 мг/кг и продолжали регистрацию еще в течение 1 ч. Электростимуляция VTA вызывала увеличение содержания внеклеточного дофамина в течение 1.45 ± 0.03 с с амплитудой 4.6 ± 0.3 нА. Последующее введение фенамина на фоне стимуляции увеличивало длительность сигнала до 5.2 ± 0.1 с и его амплитуду до 20.8 ± 0.9 нА, что соответствует пропорциональному увеличению количества дофамина. Данная реакция была максимально выражена на 45-й минуте после введения фенамина. Исследованные зоны VTA были также протестированы на наличие реакции самостимуляции в тесте “подъема”, когда инструментальная реакция для получения внутримозгового подкрепления заключалась в подъеме головы на 38 градусов в беспроводной телеметрической установке. Реакцию самостимуляции тестировали до введения фенамина и после его введения в течение 1 ч. Установлено, что число подъемов для получения внутримозгового подкрепления увеличивалось к 45-й минуте после введения фенамина. Таким образом, в настоящем исследовании было показано, что стимуляция зон положительного подкрепления в VTA вызывает (у наркотизированных животных) стабильные, продолжительные эффекты фазического высвобождения дофамина, после введения непрямого адrenomиметика фенамина активация высвобождения дофамина соответствует по времени изменениям параметров самостимуляции, наблюдаемым после введения вещества. Кроме того, объединение метода FSCV и метода самостимуляции позволяет более четко и надежно, под контролем регистрации выброса дофамина, локализовать стимулирующий электрод в VTA. Это дает основания для применения данного метода, состоящего из двух экспе-

риментов: 1) регистрация высвобождения дофамина с помощью FSCV у наркотизированных животных; 2) исследование реакции самостимуляции на этих животных. Такой подход имеет перспективы для стандартизации протоколов оценки действия сенсорных и фармакологических агентов на дофамин-зависимые формы поведения.

Ключевые слова: дофамин, самостимуляция, циклическая вольтамперометрия с быстрым сканированием

DOI: 10.31857/S0869813922100107

Внутри мозговая самостимуляция является одной из известных моделей для исследования механизмов вознаграждения и аддикции [1, 2]. Суть методики самостимуляции состоит в том, что животное, нажимая на педаль (или совершая другие инструментальные реакции для получения внутри мозгового подкрепления), производит электрическое раздражение участков мозга с помощью вживленного электрода [3]. Нейромедиатор дофамин традиционно ассоциируется с нейрхимическими исследованиями механизмов подкрепления при самостимуляции [4, 5]. В частности, препараты, активирующие дофаминергическую систему мозга, такие как амфетамин, кокаин повышают число нажатий педали и снижают пороги реакции самостимуляции [6, 7]. Показано, что структуры мозга, при прямом или опосредованном раздражении которых наблюдается интенсивная реакция самостимуляции, содержат дофаминергические нейроны [8]. Избирательная активация дофаминергических нейронов, как показали оптогенетические исследования, достаточна для облегчения развития реакции самостимуляции [9]. Важную роль в подкрепляющих эффектах электрической самостимуляции латерального гипоталамуса играют нисходящие волокна медиального пучка переднего мозга, направляющиеся в вентральную область покрышки (ventral tegmental area, VTA) [10]. При этом отдельные нейроны латерального гипоталамуса активируют дофаминергические клетки VTA во время самостимуляции за счет высвобождения возбуждающих нейромедиаторов, таких как ацетилхолин и глутамат [11, 12].

Регистрация высвобождения дофамина при самостимуляции была впервые выполнена с использованием метода прижизненного микродиализа, который определяет изменения тонического внеклеточного уровня дофамина. Этот метод показал повышение концентрации внеклеточного дофамина во время самостимуляции с последующим снижением до базального уровня после завершения исследования [13]. Развитие быстро-сканирующей циклической вольтамперометрии (fast scan cyclic voltammetry, FSCV) дало возможность наблюдать кинетику дофамина во временной шкале, соответствующей поведенческим реакциям (фазические колебания внеклеточного уровня дофамина с временным разрешением меньше секунды) [14]. В отличие от микродиализа, регистрация методом FSCV в прилежащем ядре (nucleus accumbens) выявила снижение фазического выброса дофамина во время длительной самостимуляции вплоть до предела его измерения [15]. Однако дальнейшее совершенствование метода FSCV показало, что фазическое высвобождение дофамина не исчезает при длительной самостимуляции, а снижается до меньших, устойчивых уровней, ранее не обнаруживаемых [16]. Таким образом, из приведенных данных литературы можно сделать вывод, что фазическое высвобождение дофамина отмечается только в начале серии самостимуляции, а дальнейшая непрерывная и длительная самостимуляция уже не всегда позволяет его полностью зарегистрировать (необходимо использовать дополнительные методы оценки). Поэтому для исследования механизмов положительного подкрепления при самостимуляции более целесообразно регистрировать и анализировать выброс дофамина в ответ на навязанную стимуляцию области мозга, которая протестирована также и на наличие

реакции самостимуляции. Такой подход также имеет перспективы и для оценки действия сенсорных и фармакологических агентов.

Целью работы было установление возможности использования метода быстросканирующей циклической вольтамперометрии для регистрации выброса дофамина в прилежащем ядре в ответ на электрическую стимуляцию той зоны вентральной области покрышки, которая используется для изучения реакции самостимуляции у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проведен на 9 крысах-самцах линии Вистар средней массой 250 г в соответствии с этическими принципами работы с лабораторными животными, изложенными в Директиве Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г., одобренной комиссией по биоэтике ФГБНУ “ИЭМ”. Было проведено два эксперимента. В первом эксперименте проводили регистрацию высвобождения дофамина в прилежащем ядре *in vivo* методом быстросканирующей циклической вольтамперометрии в ответ на электрическую стимуляцию зоны VTA, а во втором эксперименте на тех же животных тестировали реакцию самостимуляции VTA.

Секреторную активность дофаминергических нейронов *in vivo* оценивали по изменению уровня дофамина в межклеточном пространстве прилежащего ядра методом быстросканирующей циклической вольтамперометрии в ответ на электрическую стимуляцию VTA на оборудовании, изготовленном в мастерских ФГБНУ ИЭМ (Санкт-Петербург). Преимущество быстросканирующей циклической вольтамперометрии – высокая степень временного и пространственного разрешения. Временное разрешение обеспечивается частотой сканирования – 10 раз в секунду, пространственное разрешение определяется размерами сенсора (углеволокно длиной 100 мкм и толщиной 7 мкм) [19]. Перед экспериментом на животных сенсорный углеродный микроэлектрод в стеклянной изоляции калибровали *in vitro*. При увлечении концентрации дофамина в растворе наблюдалось дозозависимое увеличение электрического сигнала.

Крыс наркотизировали золетилом-100, в дозе 50 мг/кг (Valdepharm, Франция). В правую вентральную область покрышки вживляли стимулирующий электрод (стальной биполярный электрод с изоляцией толщиной 0.2 мм) по координатам относительно Bregma: AP = –5.3 мм, L = 0.8 мм, H = 8.2 мм [17]. Сенсорный углеродный микроэлектрод в стеклянной изоляции (длина открытого кончика 100 мкм и толщина 7 мкм), регистрирующий уровень дофамина, имплантировали ипсилатерально в прилежащее ядро с использованием стереотаксических координат: AP = +2.0 мм (от Bregma); L = 1.2 мм; H = 6.8 мм от поверхности черепа [17]. Имплантировали также электрод сравнения из прессованного Ag/AgCl диаметром 3 мм. Он располагался на поверхности черепа AP = +5.5 мм относительно Bregma; L = 0. Для его крепления использовался стоматологическую акриловую пасту с УФ-отверждением. Электроды (и стимулирующий и регистрирующий) перемещали до получения максимального выброса дофамина и затем фиксировали. Стимуляцию VTA производили пачками прямоугольных электрических импульсов с интервалом 3 мин в течение 1 ч (сила тока 240 мкА, длительность импульса 1 мс с частотой 100 Гц в течение 0.5 с). Затем вводили фенамин в дозе 1 мг/кг внутривентрально и продолжали регистрацию еще 1 ч. Использовали продолжительность сканирования 10 мс и потенциал удержания – 0.4 В, при величине анодного предела +1.3 В (рис. 1). Далее в течение 1 недели животное изолировали для восстановления после оперативного вмешательства.

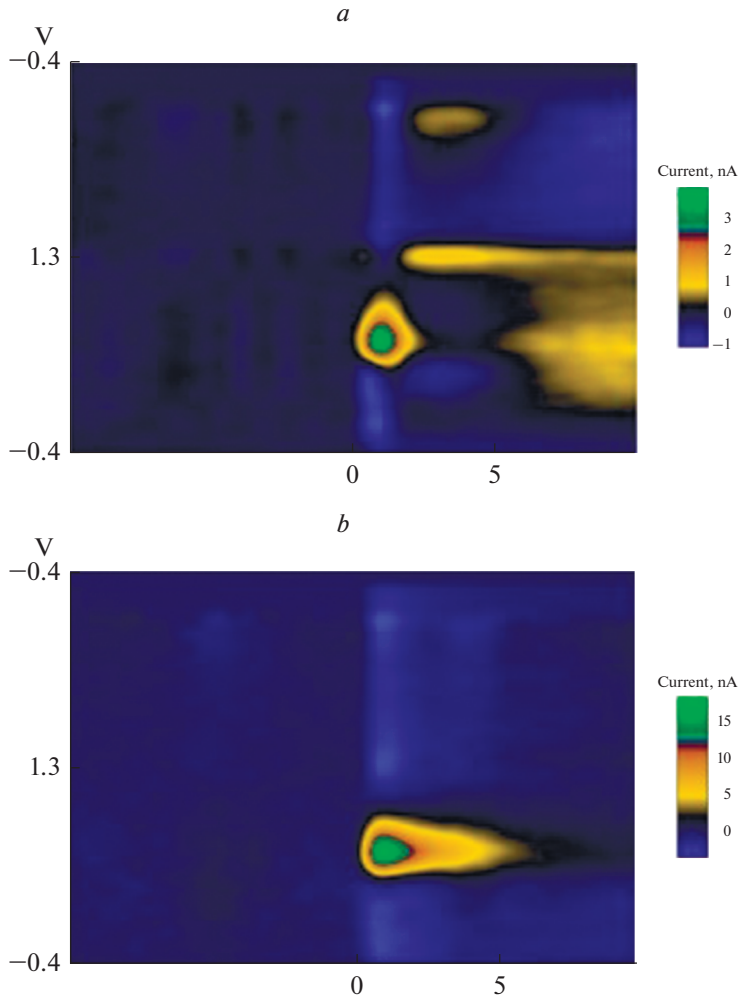


Рис. 1. Кинетика изменения внеклеточного уровня дофамина в прилежащем ядре в ответ на электрическую стимуляцию зоны вентральной области покрышки.

Показана вольтамперограмма после стимуляции вентральной области покрышки до (а) и через 45 мин после инъекции фенамина (b). Цветовая шкала отражает величину изменения электрического тока по сравнению с его уровнем в точке 0 по оси времени.

Для анализа полученных данных использовали веб-приложение Analysis Kid (созданное лабораторией Hashemi Lab) с инструментами калибровки и анализа данных для сигналов электроактивных молекул при циклической вольтамперометрии с быстрым сканированием. Analysis Kid предоставляет приложение с открытым исходным кодом, которое позволяют визуализировать, фильтровать, калибровать и анализировать нейрохимические сигналы [20].

В дальнейшем, при тестировании реакции самостимуляции в фиксированном режиме, использовались пачки импульсов с такими же характеристиками, но меньшей силой тока (длительность пачки импульсов составляла 0.5 с, для получения повторного внутримозгового подкрепления животное обучалось совершать инструментальное движение головы вниз и вновь инструментальное движение вверх).

Для воспроизведения реакции самостимуляции у крыс использовался акселерометр в составе устройства регистрации, который устанавливали параллельно плоскости черепа. В реальном времени в градусах вычислялись тангаж — наклон головы вперед—назад (нос вверх—вниз) крен — наклон головы (одно ухо выше другого). Для самостимуляции задавались 3 параметра: 1) углема (в градусах) — подъем головы животного на этот угол автоматически вызывает электрический стимул; 2) угол сброса (в градусах) — после начала стимула крыса должна опустить голову до этого угла, иначе следующего стимула производиться не будет; 3) максимальный крен (в градусах) — это ограничение можно вводить для того, чтобы животное поднимало голову в одной плоскости. Задаваемые параметры электростимуляции были стандартные: длительность импульса (1 мс), частота (100 Гц), количество импульсов (50), угол подъема 38 градусов, угол сброса 0 градусов, максимальный крен не использовался. Устройством располагалось на голове животного, связь с компьютером осуществлялось посредством телеметрии.

Животное помещалось в специальную кольцевую камеру (внешний диаметр цилиндра 50 см, внутренний диаметр 26 см), где параметры движения животного регистрировались автоматически с помощью телеметрической установки и компьютера. Для появления ориентировочно-исследовательской реакции при обучении использовали одновременную кратковременную подачу светового и звукового раздражителей (1 с), которая использовалась для провокации поднятия животным головы. Анализировали число поднятий головы за каждую минуту для получения внутримозгового подкрепления в фиксированном режиме FR1 (подкреплялся каждый подъем головы) и порог реакции самостимуляции (в мкА). Для определения порога реакции самостимуляции подавался ток в навязанном режиме нарастающими порциями (priming stimulation) длительностью по 5 с шагом по 2 мкА до появления реакции поднятия головы. Затем повышали силу тока на 50% от пороговых значений, когда наблюдали выраженную реакцию самостимуляции, и включали режим снижения силы тока (шаг 2 мкА длительностью стимуляции 5 с) до появления отказа от поднятия головы. Процедуру поиска пороговых значений силы тока повторяли 2 раза. При совпадении значений силы тока, полученных с использованием нарастающего и снижающего режимов, его считали порогом реакции самостимуляции [3]. В дальнейшем использовали надпороговую силу тока на 50% выше пороговых значений. Отмеченная интенсивность электрического раздражения структур головного мозга при самостимуляции в режиме FR1 часто используется в аналогичных экспериментах [18]. Преимущество нашего метода заключается в том, что реакцию самостимуляции можно выработать в течение минут при минимальных сроках ее стабилизации. Для анализа реакции самостимуляции как дофамин-зависимой реакции применяли непрямой адrenomиметик фенамина гидрохлорид (1 мг/кг, внутривбрюшинно).

По завершении опытов был произведен морфологический контроль локализации электродов. Животных умерщвляли передозировкой нембутала и перфузировали физиологическим раствором, фиксировали в формалине, выделяли мозг и заливали целлоидином, делали фронтальные срезы и окрашивали крезиловым фиолетовым по методу Ниссля (рис. 2). Область расположения электродов верифицировали после завершения эксперимента в гистологических срезах мозга, используя стереотаксический атлас [17]. Для морфологической верификации следа стимулирующего электрода в вентральной области покрышки делали фронтальный разрез на уровне Bregma -5.3 мм (рис. 2a), согласно стереотаксическому атласу [17]. В этой области территория вентральной покрышки наиболее обширна и представлена дофаминергическим паранигральным ядром среднего мозга. Для верификации следа регистрирующего (сенсорного) электрода в прилежащем ядре делали фронтальный срез на уровне Bregma $+2.7$ мм (рис. 2b) согласно атласу. Далее продолжали иссе-

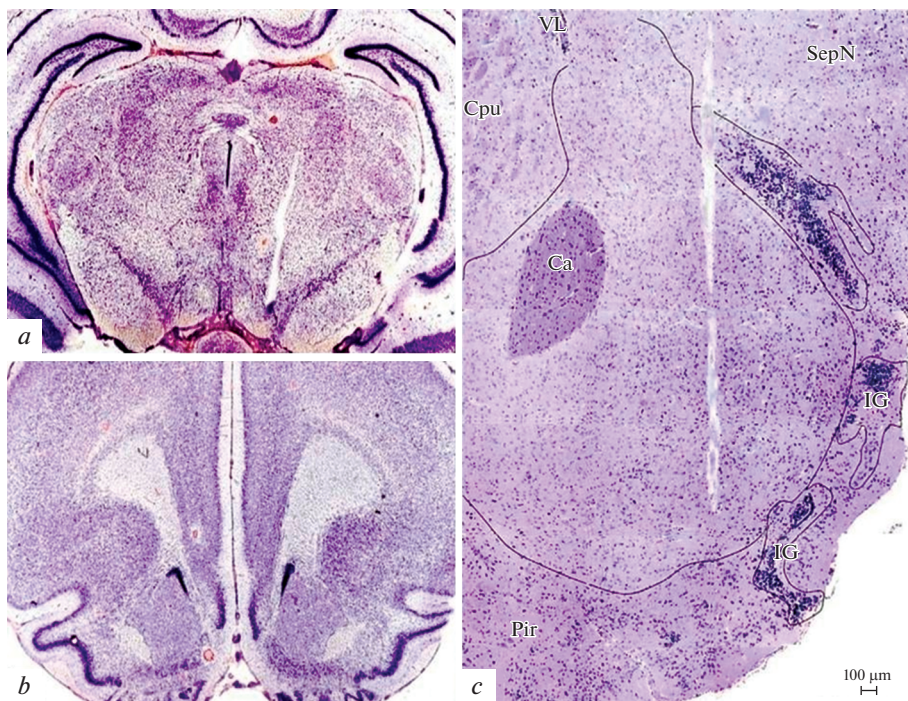


Рис. 2. Морфологический контроль следа электродов в головном мозге крыс.

След электрода для стимуляции в VTA на уровне Bregma -5.3 мм: (а), ок. $\times 4$, об. $\times 10$. (б) — область начала поиска следа тонкого регистрирующего электрода на уровне Bregma $+2.7$ мм, ок. $\times 4$, об. $\times 10$. (с) — передняя часть прилежащего ядра с дефектом мозга из области вживления тонкого регистрирующего электрода на уровне Bregma $+2.0$, ок. $\times 10$, об. $\times 10$. IG — обонятельные ядра, CPU — стриопаллидарный комплекс, Pir — грушевидная кора, SepN — ядра перегородки, VL — боковой желудочек, ca — передняя спайка мозга. Окраска методом Ниссля.

кать срезы на протяжении $0.7-1$ мм до той части переднего мозга, в которой прилежащее ядро занимает наибольшую площадь (рис. 2с). В этой области передняя спайка смещалась к верхней медиальной части ядра, тогда как в его наиболее крупной средней части располагался след регистрирующего электрода (рис. 2с).

Полученные данные анализировали с использованием пакета статистических программ GraphPad PRISM 6.0. Различия в показателях уровня секреции дофамина и реакции самостимуляции оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с применением поправки Бонферрони для множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего арифметического.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электростимуляция зоны VTA вызывала увеличение содержания внеклеточного дофамина в течение 2 с, что проявлялось увеличением силы тока на 5 нА (в максимуме) во время достижения сканирующим импульсом напряжения окисления дофамина с максимальной амплитудой 5 нА. Введение фенамина на фоне стимуляции зоны положительного подкрепления увеличивало как длительность повышения силы тока до 5 с, так и амплитуду до 18 нА, что соответствует пропорциональному увели-

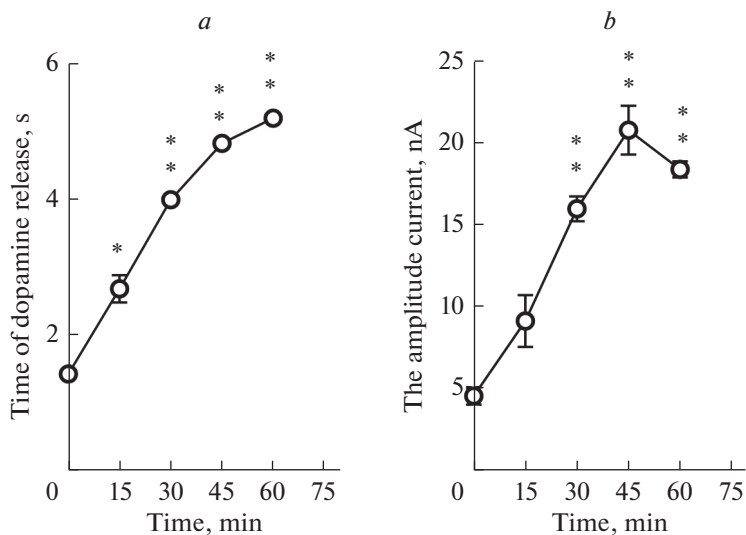


Рис. 3. Динамика величины фазических волн повышения дофамина в прилежащем ядре в ответ на электрическую стимуляцию вентральной области покрышки после внутрибрюшинного введения фенамина 1 мг/кг.

Показана продолжительность (а) и амплитуда (b) волн увеличения уровня дофамина в прилежащем ядре. 0 – до введения фенамина, далее 15, 30, 45 и 60 мин после внутрибрюшинного введения фенамина.

* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ относительно значений до введения фенамина.

чению количества дофамина. Максимально данная реакция была выражена на 45-й минуте после введения фенамина (рис. 3).

Таким образом, при стимуляции той зоны VTA, которая в дальнейшем была протестирована на наличие реакции самостимуляции, наблюдается увеличение фазического повышения уровня дофамина при введении фенамина.

На втором этапе исследований, после проведения экспериментов по регистрации высвобождения дофамина в прилежащем ядре, было проведено тестирование реакции самостимуляции. Исследования показали, что пороговая для самостимуляции сила тока составляла от 54 до 88 мкА. Все животные поднимали голову для самостимуляции более 250 раз за 10 мин. Тестирование самостимуляции производили до введения фенамина и сразу после его введения в течение 1 ч. Было установлено, что число подъемов головы для самостимуляции увеличивается к 45-й минуте после введения (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство исследователей сходятся во мнении, что высвобождение дофамина в прилежащем ядре играет важную роль в механизмах внутримозгового подкрепления при выработке реакции самостимуляции. Доказательством важности дофамина при самостимуляции являются снижение ответа у крыс с поражением дофаминергических нейронов [21, 22], прекращение самостимуляции после введения антагонистов рецепторов дофамина в прилежащее ядро [23, 24] и нарушение поведения самостимуляции у мышей с нокаутом по гену D1-рецепторов [25]. В настоящей работе была произведена регистрация высвобождения дофамина в прилежащем ядре с помощью быстросканирующей циклической вольтамперометрии в

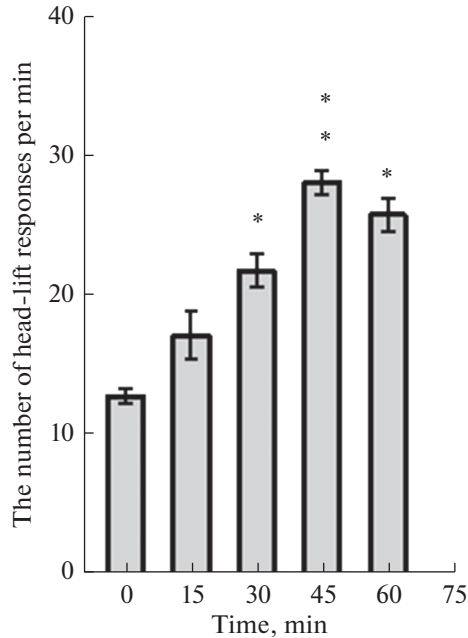


Рис. 4. Изменение числа реакций подъема головы для внутримозгового подкрепления после внутрибрюшинного введения фенамина 1 мг/кг. Показано число реакций подъема головы. 0 – до введения фенамина, далее 15, 30, 45 и 60 мин после внутрибрюшинного введения фенамина. * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ относительно значений до введения фенамина.

ответ на электрическую стимуляцию вентральной области покрышки, зоны под электродом, которая в дальнейшем была протестирована на наличие реакции самостимуляции. На основе анализа данных литературы мы сделали заключение о том, что для исследования механизмов подкрепления при самостимуляции более целесообразно регистрировать и анализировать подъем уровня дофамина в ответ на навязанную стимуляцию области мозга, при стимуляции которой наблюдается и реакция самораздражения. В условиях свободного поведения интервалы между нажатиями педали (в нашем случае инструментальные движения головы, необходимые для получения внутримозгового подкрепления) при самостимуляции обычно сильно варьируют – от 0.1 до 10 с, отдельные высвобождения дофамина при последовательных нажатиях педали могут накладываться друг на друга и давать неясную картину при регистрации вольтамперограмм. Поэтому в настоящих исследованиях при изучении фазического высвобождения дофамина у наркотизированных животных подавали пачку импульсов каждые 3 мин (длительностью 0.5 с) с фиксированной силой тока. В ряде исследований показано, в частности, что фазическое высвобождение дофамина отмечается лишь в начале серии самостимуляции, а дальнейшая непрерывная и длительная самостимуляция уже не позволяет его полностью зарегистрировать (необходимо использовать дополнительные методы оценки) [16]. Более того, в ряде исследований обнаружено, что при непрерывной самостимуляции в режиме FR1 высвобождение дофамина подавляется [26]. Показано, что при увеличении временного интервала между подачей подкрепления в режиме FR8 (когда подкрепляется только каждое 8-е нажатие педали) можно

зарегистрировать стабильное высвобождение дофамина во время самостимуляции [27]. В пользу применения навязанной стимуляции зон положительного подкрепления у наркотизированных животных говорит и неконтролируемое частое, спонтанное высвобождение дофамина в ответ на обстановочные раздражители у животных в свободном поведении, вызывающие активацию и ориентировочную реакцию [28].

В настоящем исследовании показано, что в ответ на раздражение зоны самостимуляции VTA наблюдается кратковременное высвобождение дофамина в прилежащем ядре, а после введения фенамина оно значительно увеличивается. В то же время высвобождение дофамина в прилежащем ядре после введения фенамина не только значительно увеличивается по сравнению с показателями до введения вещества, но и нарастает к 45-й минуте после его введения. Эти закономерности были найдены как по амплитуде, так и по длительности высвобождения дофамина. Необходимо отметить, что подкрепляющие свойства электрического раздражения при самостимуляции VTA после введения фенамина так же, как и высвобождение дофамина в прилежащем ядре не только значительно увеличиваются по сравнению с показателями до введения вещества, но и нарастают к 45-й минуте после его введения. Эти закономерности показаны по числу инструментальных реакций поднятия головы для получения внутримозгового подкрепления в режиме FR1 при фиксированной силе тока, превышающей пороговую для самостимуляции на 50%. Полученные данные во многом согласуются с данными литературы [29]. При этом в большинстве проведенных экспериментов описываются отдельные стороны настоящей работы, либо по изучению отдельно реакции самостимуляции, либо по изучению высвобождения дофамина с помощью быстросканирующей циклической вольтамперометрии. Показано, в частности, что активирующие эффекты ряда фармакологических веществ объясняются их способностью повышать уровень дофамина в прилежащем ядре [29]. Механизмы повышения уровня дофамина при этом различаются. Ранее считалось, что вещества психостимулирующего типа действия вызывают отток (efflux) дофамина [30]. Это независимый от потенциала действия неэкзоцитотический тип высвобождения опосредуется нарушением механизмов обратного захвата дофамина нейронами и связан с его истощением в синаптических везикулах [31]. В то же время накапливается все больше данных об участии потенциал-зависимых механизмов в действии психостимулирующих средств [32]. Фазические сигналы, генерируемые импульсным возбуждением дофаминовых нейронов, имеют решающее значение для обучения, связанного с вознаграждением, и опосредуют действие веществ на систему положительного подкрепления [33].

Подобные эффекты были описаны для внутрибрюшинного введения фенамина [32]. Он напрямую действует на везикулярный транспортер моноаминов, что приводит к нарушению обратного транспорта дофамина [34]. Механизм его действия также зависит от дозы вещества. В малой дозе, которая использовалась в настоящей работе, блокада обратного транспорта дофамина преобладает, при этом отток дофамина играет второстепенную роль из-за ограниченного уровня дофамина в цитозоле. Отток дофамина преобладает при введении умеренных и высоких доз вещества, когда дофамин перераспределяется из везикулярных пулов в цитозольные [35]. Известно, что наибольший эффект на положительную систему подкрепления при самостимуляции наблюдается при использовании низких доз (0.5–1.5 мг/кг внутрибрюшинно), а средние и высокие его дозы вызывают стереотипию [36].

Таким образом, в настоящем исследовании было показано, что стимуляция зон положительного подкрепления у наркотизированных животных вызывает стабильные, продолжительные эффекты фазического высвобождения дофамина, и после введения непрямого адrenomиметика фенамина активация высвобождения дофа-

мина соответствует по времени изменениям параметров самостимуляции, наблюдаемым после введения вещества. Кроме того, объединение метода FSCV и метода самостимуляции позволяет более четко и надежно, под контролем регистрации выброса дофамина, локализовать стимулирующий электрод в VTA. Это дает основание для применения данного метода, состоящего из двух экспериментов: 1) регистрация высвобождения дофамина с помощью быстросканирующей циклической вольтамперометрии у наркотизированных животных и 2) исследование реакции самостимуляции. Такой подход также имеет перспективы для стандартизации протоколов оценки действия сенсорных и фармакологических агентов на дофамин-зависимые формы поведения.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.С.П. – проведение операций, тестирование экспериментальных животных; В.В.С.– техническое обеспечение, проведение операций и экспериментов; А.А.Л.– планирование эксперимента, написание и редактирование статьи; Е.Р.Б. – статистическая обработка данных, написание и редактирование статьи; В.Н.М. – написание и редактирование статьи; А.В.Д. – проведение морфологических исследований; П.Д.Ш. – написание и редактирование статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Olds J, Milner P* (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47(6): 419–427. <https://doi.org/10.1037/h0058775>
2. *Carlezon WA, Chartoff EH* (2007) Intracranial self-stimulation(ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation. *Nat Protoc* 2(11): 2987–2995. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.441>
3. *Lebedev AA, Bessolova YN, Efimov NS, Bychkov ER, Droblenkov AV, Shabanov PD* (2020) Role of orexin peptide system in emotional overeating induced by brain reward stimulation in fed rats. *Res Results Pharmacol* 6(1): 81–91. <https://doi.org/10.3897/rpharmacology6.52180>
4. *Phillips AG, Fibiger HC* (1978) The role of dopamine in maintaining intracranial self-stimulation in the ventral tegmentum, nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *Can J Psychol* 32(2): 58–66. <https://doi.org/10.1037/h0081676>
5. *Бычков ЕР, Лебедев АА, Ефимов НС, Крюков АС, Карпова ИВ, Пюрвеев СС, Дробленков АВ, Шабанов ПД* (2020) Особенности вовлечения дофаминергической и серотонинергической систем мозга в положительные и отрицательные эмоциональные состояния у крыс. Обзоры клин фармакол лекарств терапии 18(2):123–130. [*Bychkov ER, Lebedev AA, Efimov NS, Kryukov AS, Karпова IV, Pyurveev SS, Droblenkov AV, Shabanov PD* (2020) Features of the involvement of the dopaminergic and serotonergic systems of the brain in positive and negative emotional states in rats. *Obzory klin farmakol lekarstv terapii* 18 (2): 123–130. (In Russ)]. <https://doi.org/10.7816/RCF182123-130>
6. *Wise RA* (1996) Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu Rev Neurosci* 19: 319–340. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.001535>
7. *Лебедев АА, Шабанов ПД* (1992) Сопоставление реакции самостимуляции и условного предпочтения места при введении фенамина у крыс. *Журн высш нервн деятельн им ИП Павлова* 42(4): 692–698. [*Lebedev AA, Shabanov PD* (1992) Comparison of the reaction of

- self-stimulation and conditional preference of place after administration of phenamine in rats. *Zhurn vysshey nervn deyatel'n IP Pavlova* 42 (4): 692–698. (In Russ)].
8. *Corbett D, Wise RA* (1980) Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: amoveable electrode mapping study. *Brain Res* 185(1): 1–15. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90666-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90666-6)
 9. *Steinberg EE, Boivin JR, Saunders BT, Witten IB, Deisseroth K, Janak PH* (2014) Positive reinforcement mediated by midbrain dopamine neurons requires D1 and D2 receptor activation in the nucleus accumbens. *PLoS One* 9 e94771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094771>
 10. *Yeomans JS, Maidment NT, Bunney BS* (1988) Excitability properties of medial forebrain bundle axons of A9 and A10 dopamine cells. *Brain Res* 450(1–2): 86–93. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)91547-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91547-8)
 11. *Somers LA, Beyene M, Carelli RM, Wightman RM* (2009) Synaptic overflow of dopamine in the nucleus accumbens arises from neuronal activity in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 29(6): 1735–1742. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5562-08.2009>
 12. *Shabanov PD, Lebedev AA* (2013) Involvement of GABA- and dopaminergic mechanisms of the bed nucleus of the stria terminalis in the reinforcing effects of psychotropic substances mediated via the lateral hypothalamus. *Neurosci Behav Physiol* 43(4): 485–491. <https://doi.org/10.1007/s11055-013-9759-3>
 13. *Fiorino DF, Coury A, Fibiger HC, Phillips AG* (1993) Electrical stimulation of reward sites in the ventral tegmental area increases dopamine transmission in the nucleus accumbens of the rat. *Behav Brain Res* 55(2): 131–141. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90109-4](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90109-4)
 14. *Garris PA, Kilpatrick M, Bunin MA, Michael D, Walker QD, Wightman RM* (1999) Dissociation of dopamine release in the nucleus accumbens from intracranial self-stimulation. *Nature* 398(6722): 67–69. <https://doi.org/10.1038/18019>
 15. *Keithley RB, Carelli RM, Wightman RM* (2010) Rank estimation and the multivariate analysis of in vivo fast-scan cyclic voltammetric data. *Anal Chem* 82(13): 5541–5551. <https://doi.org/10.1021/ac100413t>
 16. *Rodeberg NT, Johnson JA, Bucher ES, Wightman RM* (2016) Dopamine dynamics during continuous intracranial self-stimulation: effect of waveform on fast-scan cyclic voltammetry data. *ACS Chem Neurosci* 7(11): 1508–1518. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00142>
 17. *Paxinos G, Watson C* (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinate*. 4-th ed. Paxinos G, Watson C (eds). Sydney, Orlando, San Diego, New-York, Austin, London, Montreal, Toronto. Acad Press.
 18. *Шабанов ПД, Лебедев АА, Мещеров ШК* (2002) Дофамин и подкрепляющие системы мозга. Санкт-Петербург. [*Shabanov PD, Lebedev AA, Mescherov ShK* (2002) Dopamine and the reinforcing systems of the brain. Saint Petersburg. (In Russ)].
 19. *Мухин ВН, Сизов ВВ, Павлов КИ, Клименко ВМ* (2017) β -амилоид 25–35 подавляет секреторную активность дофаминергических систем мозга крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 103(12): 1350–1360. [*Mukhin VN, Sizov VV, Pavlov KI, Klimenko VM* (2017) β -amyloid 25-35 suppresses the secretory activity of the dopaminergic systems of the rat brain. *Russ J Physiol* 103(12): 1350–1360. (In Russ)].
 20. *Mena S, Dietsch S, Berger SN, Witt CE, Novel PH* (2021) User-friendly experimental and analysis strategies for fast voltammetry: the Analysis Kid for FSCV. *ACS Meas* 1(1): 11–19.
 21. *Fibiger HC, LePiane FG, Jakubovic A, Phillips AG* (1987) The role of dopamine in intracranial self-stimulation of the ventral tegmental area. *J Neurosci* 7(12): 3888–3896. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-12-03888.1987>
 22. *Petrov ES, Lebedev AA* (1997) Dopamine and the reinforcing system of the brain. *Neurosci Behav Physiol* 27(3): 309–311.
 23. *Smith KS, Tindell AJ, Wayne AJ, Berridge KC* (2009) Ventral pallidum roles in reward and motivation. *Behav Brain Res* 196(2): 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.038>
 24. *Шевелева МВ, Лебедев АА, Роик РО, Шабанов ПД* (2013) Нейробиологические механизмы систем награды и наказания в головном мозге при активации прилежащего ядра. *Обзоры клин фармакол лекарств терапии* 11(3): 3–19. [*Sheveleva MV, Lebedev AA, Roik RO, Shabanov PD* (2013) Neurobiological mechanisms of reward and punishment systems in the brain upon activation of the nucleus accumbens. *Obzory klin farmakol lekarstv terapii* 11(3): 3–19. (In Russ)].
 25. *Tran AH, Tamura R, Teruko U, Kobayashi T, Katsuki M, Taketoshi O* (2005) Dopamine D1 receptors involved in locomotor activity and accumbens neural responses to prediction of reward

- associated with place. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(6): 2117–2122.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0409726102>
26. *Cheer JF, Wassum KM, Heien ML, Phillips PE, Wightman RM* (2004) Cannabinoids enhance subsecond dopamine release in the nucleus accumbens of awake rats. *J Neurosci* 24(18): 4393–4400.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0529-04.2004>
 27. *Yavich L, Tiuhonen J* (2000) Patterns of dopamine overflow in mouse nucleus accumbens during intracranial self-stimulation. *Neurosci Lett* 293(1):41–44.
[https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01484-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01484-1)
 28. *Covey DP, Bunner KD, Schuweiler D R, Cheer JF, Garris PA* (2000) Amphetamine elevates nucleus accumbens dopamine via an action potential-dependent mechanism that is modulated by endocannabinoids. *Eur J Neurosci* 43(12):1661–1673.
<https://doi.org/10.1016/s0304>
 29. *Nestler EJ* (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8(11):1445–1449.
<https://doi.org/10.1038/nn1578>
 30. *Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA* (1993) Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 639–677.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.33.040193.003231>
 31. *Sulzer D* (2011) How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron* 69(4): 628–649.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.010>
 32. *Daberkow DP, Brown HD, Bunner KD, Kraniotis SA, Doellman MA, Ragozzino ME, Garris PA, Roitman MF* (2013) Amphetamine paradoxically augments exocytotic dopamine release and phasic dopamine signals. *J Neurosci* 33(2): 452–463.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2136-12.2013>
 33. *Hamid AA, Pettibone JR, Mabrouk OS, Hetrick VL, Schmidt R, Vander Weele CM, Kennedy RT, Aragona BJ, Berke JD* (2016) Mesolimbic dopamine signals the value of work. *Nature Neurosci* 19(1): 117–126.
<https://doi.org/10.1038/nn.4173>
 34. *Rothman RB, Baumann MH* (2003) Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol* 479(1-3): 23–40.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.08.054>
 35. *Sulzer D* (2011) How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron* 69(4): 628–649.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.010>
 36. *Kafkafi N, Levi-Havusha S, Golani I, Benjamini Y* (1996) Coordination of side-to-side head movements and walking in amphetamine-treated rats: A stereotyped motor pattern as a stable equilibrium in a dynamical system. *Biol Cybern* 74(6):487–495.
<https://doi.org/10.1007/BF00209420>

Registration of Changes in the Level of Extracellular Dopamine in the Nucleus Accumbens by Fast-Scan Cyclic Voltammetry during Stimulation of the Zone of the Ventral Tegmental Area, which Also Caused a Self-Stimulation

S. S. Pyurveev^{a, b}, V. V. Sizov^a, A. A. Lebedev^{a, *}, E. R. Bychkov^a, V. N. Mukhin^a, A. V. Droblenkov^a, and P. D. Shabanov^a

^a*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

^b*St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

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

The aim of the work was to establish the possibility of using fast scan cyclic voltammetry method of recording of dopamine release in the nucleus accumbens in response to electrical stimulation of that zone of ventral tegmental area (VTA) which used to study the possibility of forming a self-stimulation response in rats. Fast-scan cyclic voltammetry in vivo was used to record the release of dopamine in the nucleus accumbens in response to electrical stimulation of the VTA, and then the self-stimulation reaction of the same VTA zones was worked out in these animals. At the first stage, the anesthetized animals were stimulated (240 μ A) with a burst of pulses with self-stimulation parameters (100 Hz), lasting 0.5 s every 3 min for 1 h. Then phenamine (1 mg/kg) was injected, and recording

was continued for 1 more hour. VTA electrical stimulation caused an increase in the content of extracellular dopamine for 1.45 ± 0.03 seconds with a maximum amplitude of 4.6 ± 0.3 nA. The administration of phenamine during stimulation of the zone of positive reinforcement increased both the duration of the phasic dopamine reaction to 5.2 ± 0.1 seconds and the amplitude of this up to 20.8 ± 0.9 nA, which corresponds to a proportional increase in the amount of DA. This reaction was maximally expressed at 45 minutes. The studied VTA zones were also tested for the suitability for a self-stimulation response formation in the "rise" test, when the instrumental response was to raise the head for 38 degrees in a wireless telemetry setup. The self-stimulation response was tested before the administration of phenamine and after that for 1 hour. It was found that the number of rises to receive intracerebral reinforcement increased by 45 minutes after the administration of phenamine. Thus, the present study shows that stimulation of zones of positive reinforcement in the VTA in anesthetized animals causes stable, long-lasting effects of phasic dopamine release. Activation of dopamine release after phenamine administration corresponds in time to changes in self-stimulation. In addition, the combination of the FSCV method and the self-stimulation makes it possible to localize the stimulating electrode in the VTA more clearly and reliably, under the control of dopamine release registration. This gives grounds for the application of this method, in the form of two experiments: 1. registration of dopamine release using fast-scan cyclic voltammetry in anesthetized animals, and 2. study of the self-stimulation response. This approach holds promise for standardizing protocols for evaluating the effects of sensory and pharmacological agents on dopamine-dependent behaviors.

Keywords: dopamine, self-stimulation, fast-scan cyclic voltammetry

ВЛИЯНИЕ НЕФРЭКТОМИИ НА ВЫЗВАННОЕ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЕЙ ИЗМЕНЕНИЕ ТОНУСА АРТЕРИЙ НОРМОТЕНЗИВНЫХ И СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

© 2022 г. В. Н. Ярцев*

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

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

Поступила в редакцию 16.07.2022 г.

После доработки 28.08.2022 г.

Принята к публикации 29.08.2022 г.

В опытах на сегментах верхней брыжеечной (ВБА) и внутренней сонной артерии (ВСА) крыс линий WKY и SHR изучалось влияние нефрэктомии на изменение тонуса этих артерий, вызванное их электростимуляцией. Проводилась проверка гипотезы о том, что хроническая болезнь почек (ХБП) приводит к увеличению нейрогенного тонуса сосудов как у нормотензивных, так и у гипертензивных животных. В качестве модели ХБП использовали нефрэктомию. Нейрогенную констрикцию сегментов вызывали путем стимуляции периваскулярных нервов электрическим полем в отсутствие и на фоне действия блокаторов калиевых каналов (тетраэтиламмония или глибенкламида) либо ингибитора гуанилатциклазы — метиленового синего. В отсутствие блокаторов, а также в присутствии глибенкламида нефрэктомия увеличивала нейрогенное сокращение ВБА крыс линии WKY. В отсутствие, а также на фоне действия блокаторов нейрогенный ответ ВБА крыс линии SHR после нефрэктомии не изменялся, в то время как у ВСА нефрэктомированных крыс линии WKY на фоне действия блокаторов наблюдалась более значительная по сравнению с контрольными животными констрикция, а у крыс линии SHR дилатация. Связанное с нефрэктомией усиление констрикции у крыс линии WKY наблюдалось также при действии фенилэфрина на ВБА и тетраэтиламмония на ВСА, в то время как у крыс линии SHR нефрэктомия приводила к ослаблению констрикции ВСА, вызванной фенилэфрином и тетраэтиламмонием. Полученные данные позволяют предположить, что ХБП может приводить к увеличению нейрогенного и вызванного химическими веществами тонуса сосудов у изначально нормотензивных и к его уменьшению у изначально гипертензивных животных. В наибольшей степени эти изменения могут быть выражены в ВСА и связаны с повышением активности калиевых каналов и гуанилатциклазы в данной артерии при ХБП у изначально нормотензивных и со снижением этой активности у гипертензивных животных.

Ключевые слова: внутренняя сонная артерия, нейрогенная констрикция, нефрэктомия, верхняя брыжеечная артерия, линии крыс SHR и WKY

DOI: 10.31857/S0869813922100120

Хроническая болезнь почек (ХБП) является широко распространенным заболеванием, связанным с повышенным риском сердечно-сосудистых осложнений и высокой смертностью, превышающей общую в 10–20 раз [1]. Нарушения работы сердечно-сосудистой системы у пациентов, страдающих ХБП, в частности, связаны с кальцификацией артерий и с дисфункцией эндотелия, выражающейся в

ослаблении эндотелий-зависимой вазодилатации и сопровождающейся сужением сосудов [2]. Было показано, что диметиларгинин, являющийся одним из важнейших “уремических токсинов”, подавляет продукцию эндотелием оксида азота (NO), что приводит к длительным тоническим сокращениям гладкомышечных клеток сосудов, способствуя развитию артериальной гипертензии [3, 4]. Окислительный стресс и хроническое воспаление, возникающее при ХБП, также вызывают нарушение функции эндотелия [5].

В связи с ограниченными возможностями проведения исследований на человеке было разработано несколько моделей ХБП на животных, что позволило детальнее изучить характер повреждения стенки сосудов при этом заболевании. Наиболее широко применяемой является модель с удалением 5/6 почечной ткани [6–8], приводящим к снижению клубочковой фильтрации и метаболическим нарушениям, характерным для пациентов с уремией.

Другим широко распространенным и опасным заболеванием, связанным с нарушением функционирования сердечно-сосудистой системы, является гипертоническая болезнь. Сопровождающая ее артериальная гипертензия – это ключевой фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний, стоящих на первом месте среди причин смертности во всем мире [9]. Как показали результаты исследований, проведенных на изолированных кровеносных сосудах спонтанно гипертонивных крыс, а также на людях, страдающих гипертензией, при повышенном артериальном давлении происходят структурные и функциональные изменения артерий, сопровождающиеся увеличением сократительной реакции на вазоконстрикторы, такие как норадреналин и АТФ, при этом наблюдается уменьшение дилаторной реакции на ацетилхолин [10].

Как известно, нейрогенный тонус, с помощью которого осуществляется регуляция кровотока со стороны центральной нервной системы, является важным компонентом общего сосудистого тонуса. Было обнаружено, что при гипертензии происходит усиление этого тонуса, связанное как с увеличением частоты импульсации в сосудодвигательных нервах [11], так и с усилением сократительного ответа на стимуляцию этих нервов [12, 13].

Гипертензия и ХБП являются заболеваниями, одно из которых может приводить к появлению другого [14], причем, как было показано, каждое из них изменяет сократительные свойства кровеносных сосудов, однако практически не изученным оказался вопрос о влиянии ХБП на сократительную активность артерий в случае возникновения ХБП на фоне уже имеющейся гипертонической болезни. Нам удалось обнаружить только одну работу по выяснению действия нефрэктомии на реактивность артерий спонтанно гипертонивных крыс [15]. Относительно же влияния ХБП на нейрогенный тонус кровеносных сосудов обнаружить сведений нам не удалось. Мы предположили, что ХБП, подобно гипертонии, может приводить к увеличению нейрогенного тонуса артерий и с целью проверки этого предположения провели данное исследование с использованием кровеносных сосудов как нормо-, так и гипертонивных животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на животных из ЦКП Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной Программой по сохранению и развитию биоресурсных коллекций. Опыты проводили (в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями Комиссии по биоэтике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН) на самцах крыс линии SHR через 3 месяца после нефрэктомии ($n = 9$, артериальное давление (АД) 238 ± 2 мм рт. ст.) и контрольных ($n = 11$, АД 190 ± 2 мм рт. ст., $p < 0.001$), а также на нефрэктомированных ($n = 12$,

АД 127.2 ± 2.2 мм рт. ст.) и контрольных ($n = 12$, АД 127.1 ± 1.8 мм рт. ст., $p > 0.05$) крысах линии WKY массой 250–350 г. АД измеряли манжеточным методом на хвосте с помощью электроманометра фирмы ELEMA (Швеция). ХБП моделировали путем резекции 5/6 массы почечной ткани у крыс в возрасте 3 месяца по описанной ранее методике [16]. Через 4 мес. после такой операции содержание мочевины в сыворотке крови крыс увеличивалось в среднем с 4.9 ± 0.6 до 20.1 ± 2.6 ммоль/л ($p < 0.001$) [16]. В качестве контрольных служили ложноперированные крысы, которые подвергались аналогичному оперативному вмешательству за исключением удаления почечной ткани. Эвтаназию животных осуществляли посредством эфирного наркоза. После эвтаназии отпрепаровывали левую внутреннюю сонную артерию (ВСА), а затем верхнюю брыжеечную артерию (ВБА). От каждой из этих артерий отрезали кольцевой участок длиной 2 мм, который надевали на две вольфрамовые иглолочки (диаметром 70 мкм каждая), одна из которых была соединена со штоком погружателя микроэлектродов, а вторая – с механотроном 6MX1С, сигнал от которого, отражающий изменение натяжения в стенке сегмента, усиливался и поступал на вольтметр самопишущий S-Recorder-L (ADSlab, Россия), а далее на персональный компьютер для обработки в программе S-Recorder (ADSlab, Россия). Иглолочки с кольцевым участком помещали в проточную термостатируемую (37°C) ванночку объемом 10 мл, заполненную бикарбонатным раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 115, KCl – 4.7, CaCl₂ – 2.6, MgSO₄·7H₂O – 1.2, NaHCO₃ – 25, KH₂PO₄ – 1.2, глюкоза – 10. pH раствора доводили до значения 7.4 и контролировали в течение всего эксперимента, поддерживая это значение путем пропускания через раствор соответствующего количества CO₂ или комнатного воздуха. После погружения в раствор иглолочки миографа ступенчато разводили до значения натяжения, при котором наблюдался максимальный ответ сосудистого сегмента на стимуляцию электрическим полем (30 В, 3 мс, в течение 3 с) с частотой 10 Гц. Электростимуляция осуществлялась с помощью двух платиновых электродов, расположенных на расстоянии 2 мм от сосудистого сегмента. Ранее в опытах с применением тетродотоксина (0.1 мкМ) нами было показано, что в наших методических условиях при указанных параметрах электростимуляции сокращение сосуда происходит, преимущественно, за счет раздражения его периваскулярных нервов [17]. После адаптации препарата, продолжавшейся 30 мин, начинали регистрацию натяжения стенки сосуда. С целью оценки участия Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов большой проводимости, АТФ-чувствительных K⁺-каналов и растворимой гуанилатциклазы в сосудистых реакциях в ванночку вводили соответствующие блокаторы: тетраэтиламмоний хлорид (Вектон, Россия) 10^{-3} М, глибенкламид (Sigma-Aldrich, США) 10^{-5} М или ингибитор растворимой гуанилатциклазы – метиленовый синий (Вектон, Россия) 10^{-5} М. Электростимуляцию осуществляли до и через 15 мин после введения блокатора или ингибитора в ванночку. Для оценки максимального сократительного ответа сосудистого сегмента использовали фенилэфрин (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10^{-5} М. Раствор глибенкламида получали, используя в качестве растворителя диметилсульфоксид (Вектон, Россия), широко применяемый для этой цели в экспериментах на изолированных сосудах. Маточные растворы остальных используемых веществ готовили на основе дистиллированной воды.

При статистическом анализе результатов использовали программу Statistica v. 12. Оценку нормальности распределения выборок проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Вследствие нормальности распределения полученные данные представляли в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Достоверность отличий реакций сосудов нефрэктомизированных и контрольных крыс в от-

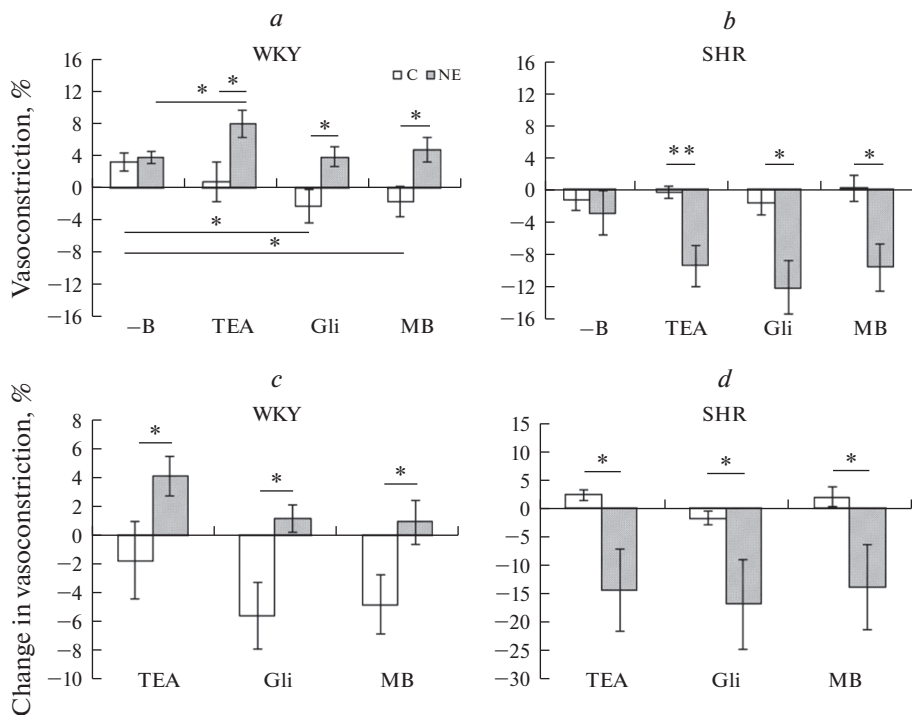


Рис. 1. Сократительная реакция (a, b) сегмента внутренней сонной артерии и изменение этой реакции по сравнению с первоначальной реакцией (c, d) на электростимуляцию сегмента данной артерии контрольных (C) и нефрэктомированных (NE) крыс линии WKY (a, c) и SHR (b, d) в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора (-B) в ванночке, а также при наличии в ней тетраэтиламмония (TEA, 10^{-3} М), глибенкламида (Gli, 10^{-5} М) или метиленового синего (MB, 10^{-5} М). Результаты выражены в % к сокращению от действия фенилэфрина. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ при сравнении с соответствующей группой.

сутствие и на фоне действия блокаторов K^+ -каналов и ингибитора гуанилатциклазы определяли, применяя двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони при последующем post-hoc анализе. Для сравнения двух выборок использовали t -критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах на ВСА контрольных и нефрэктомированных крыс линии WKY величина исходного нейрогенного сократительного ответа на электростимуляцию была примерно одинакова и составляла 0.087 ± 0.022 и 0.081 ± 0.021 мН соответственно. На фоне действия тетраэтиламмония этот ответ у контрольных крыс не изменялся, а у нефрэктомированных животных достоверно увеличивался, в то время как на фоне действия глибенкламида и метиленового синего у контрольных крыс он достоверно уменьшался и становился дилататорным, а у нефрэктомированных животных не изменялся (рис. 1a). Нейрогенный ответ нефрэктомированных крыс линии WKY на фоне действия блокаторов и ингибитора был достоверно больше, чем у контрольных.

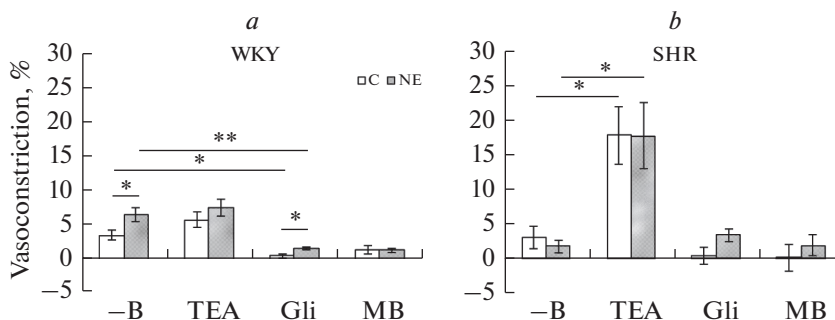


Рис. 2. Сократительная реакция сегмента верхней брыжеечной артерии на электростимуляцию сегмента этой артерии контрольных (С) и нефрэктомированных (NE) крыс линии WKY (а) и SHR (b) в условиях отсутствия блокаторов и ингибитора (–В) в ванночке, а также при наличии в ней тетраэтиламмония (TEA, 10^{-3} М), глибенкламида (Gli, 10^{-5} М) или метиленового синего (MB, 10^{-5} М). Результаты выражены в % к сокращению от действия фенилэфрина. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ при сравнении с соответствующей группой.

Реакция на электростимуляцию ВСА контрольных и нефрэктомированных крыс линии SHR была преимущественно дилататорной. Ингибитор и блокаторы не вызвали достоверного изменения нейрогенного ответа ВСА контрольных и нефрэктомированных крыс этой линии, однако на фоне их действия степень дилатации данной артерии нефрэктомированных крыс была значительно больше, чем контрольных (рис. 1b). Данное отличие связано с более значительным изменением нейрогенного ответа относительно исходного значения у нефрэктомированных животных (рис. 1d).

Величина нейрогенной констрикции ВБА нефрэктомированных крыс линии WKY была значительно больше, чем у контрольных животных и составляла 0.36 ± 0.07 и 0.15 ± 0.04 мН соответственно ($p < 0.05$). Тетраэтиламмоний и метиленовый синий не оказывали действия на величину этой констрикции в отличие от глибенкламида, который достоверно ее снижал у контрольных и нефрэктомированных крыс (рис. 2a). На фоне действия глибенкламида величина нейрогенной констрикции нефрэктомированных животных была больше соответствующего показателя контрольных крыс.

У крыс линии SHR величина нейрогенной констрикции ВБА нефрэктомированных крыс была несколько меньше, чем у контрольных животных и составляла 0.06 ± 0.03 и 0.14 ± 0.09 мН соответственно, однако это отличие было статистически недостоверным. Величина констрикторной реакции на электростимуляцию достоверно отличалась от исходного значения только на фоне действия тетраэтиламмония, и это отличие выразалось в ее значительном возрастании как у контрольных, так и у нефрэктомированных крыс (рис. 2b). Нефрэктомия не оказала влияния на величину нейрогенной констрикции ни в отсутствие, ни при наличии ингибитора и блокаторов.

Сократительная реакция на фенилэфрин у ВСА нефрэктомированных крыс линии SHR была меньше, чем у контрольных, а у ВБА нефрэктомированных крыс линии WKY больше, чем у контрольных животных (рис. 3a).

Тетраэтиламмоний сам по себе вызывал сокращение сосудов, которое для ВСА контрольных крыс линии WKY и SHR было примерно одинаковым, составляя 9.3 ± 2.4 и $8.4 \pm 1.9\%$ ($p > 0.05$) соответственно. У нефрэктомированных крыс линии WKY величина этого сокращения в 2 раза увеличилась относительно кон-

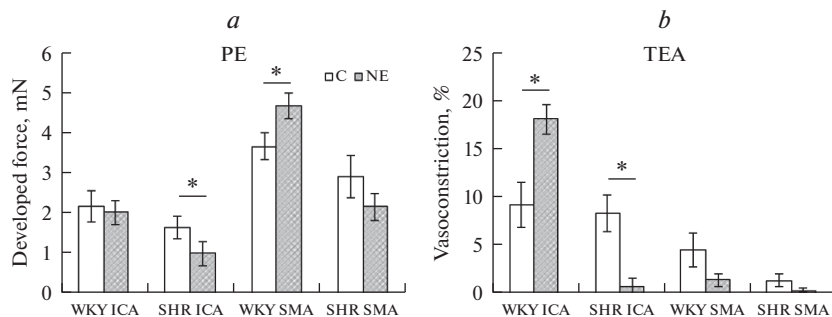


Рис. 3. Сократительная реакция на фенилэфрин (PE, 10^{-5} М) (а) и тетраэтиламмоний (TEA, 10^{-3} М) (б) сегмента верхней брыжеечной (SMA) и внутренней сонной артерии (ICA) контрольных (С) и нефрэктомированных (NE) крыс линии WKY и SHR. Результаты для TEA выражены в % к сокращению от действия фенилэфрина. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$ при сравнении с соответствующей группой.

трольных животных, в то время как у нефрэктомированных крыс линии SHR она в 10 раз уменьшилась, составляя 8.2 ± 1.5 и $0.8 \pm 0.8\%$ ($p < 0.05$) соответственно (рис. 3б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наиболее интересным, с нашей точки зрения, является обнаруженное нами разнонаправленное действие нефрэктомии при нормотонии и гипертонии, выражающееся, в частности, в увеличении вазоконстрикторной реакции ВСА на электростимуляцию у крыс линии WKY и в увеличении вазодилаторной реакции этой артерии на электростимуляцию у крыс линии SHR.

Следует заметить, что влияние нефрэктомии на нейрогенную вазомоторную реакцию ВСА проявлялось только в условиях действия блокаторов K^+ -каналов и ингибитора гуанилатциклазы. При использовании этих веществ многие авторы наблюдали уменьшение дилаторных и увеличение констрикторных реакций кровеносных сосудов. Так, например, тетраэтиламмоний ингибировал расслабление сосудов брыжейки мыши от ацетилхолина [18] и брыжеечной артерии крысы [19] от электростимуляции в условиях пресокращения этих сосудов и усиливал сокращение радиальной артерии крысы [20] от норадреналина, а также радиальной [20] и хвостовой артерии крысы [21] от электростимуляции. Аналогично тетраэтиламмоний глибенкламид ингибировал дилаторную реакцию, в частности, средней мозговой артерии крысы [22] на гипоксию, а также непресокращенных мозговых артериол крысы на гиперкапнию [23] и артериол *m. cremaster* хомяка на электростимуляцию [24]. Однако в ряде работ глибенкламид не оказывал действия на дилаторную реакцию, в частности, вызванную электростимуляцией пресокращенной базилярной артерии крысы [25], не изменял констрикторную реакцию, вызванную электростимуляцией радиальной артерии свиньи [26], а также уменьшал сокращение брыжеечной артерии крысы, вызванное фенилэфрином [27].

Анализируя опыты, в которых было показано, что различные блокаторы K_{ATP} -каналов устраняют вазоконстрикцию мозговых сосудов, вызванную гипокапническим алкалозом, Rosenblum предположил, что гипокапния уменьшала вероятность открытого состояния K_{ATP} -каналов даже больше глибенкламида, поэтому глибенкламид уменьшал сократительную реакцию этих сосудов [28]. Аналогичным образом можно предположить, что наблюдаемое в наших экспериментах на фоне действия глибенкламида уменьшение сократительной реакции ВСА и ВБА крыс ли-

нии WKY в ответ на электростимуляцию связано с тем, что электростимуляция больше глибенкламида уменьшала вероятность открытого состояния $K_{\text{АТР}}$ -каналов, а показанное нами на фоне действия тетраэтиламмония и глибенкламида большее сокращение внутренней сонной артерии на электростимуляцию у крыс линии WKY и большее расслабление этой артерии у крыс SHR после нефрэктомии по сравнению с контролем связано в первом случае с большей, а во втором с меньшей проводимостью калиевых каналов гладкомышечных клеток ВСА нефрэктомированных животных по сравнению с контрольными.

В наших опытах было показано, что при наличии в среде метиленового синего вместо констрикторной реакции на электростимуляцию сонной артерии контрольных крыс линии WKY наблюдается дилатация этого сосуда. Можно предположить, что причиной такого изменения реакции является то, что в данной артерии таких крыс в отсутствие метиленового синего активность растворимой гуанилатциклазы при электростимуляции меньше активности, проявляющейся на фоне его действия, а наблюдаемое в наших экспериментах на фоне действия метиленового синего большее сокращение ВСА в ответ на электростимуляцию у крыс WKY и большее ее расслабление у крыс линии SHR после нефрэктомии по сравнению с контролем связано в первом случае с большей, а во втором с меньшей активностью растворимой гуанилатциклазы у крыс при электростимуляции после нефрэктомии по сравнению с контрольными животными.

При электростимуляции ВСА крыс линии SHR как в условиях наличия, так и при отсутствии блокаторов калиевых каналов и ингибитора растворимой гуанилатциклазы, преимущественно, наблюдалась дилататорная реакция. Такая реакция на электростимуляцию различных артерий наблюдалась другими авторами, как правило, в условиях пресокращения этих артерий различными вазоконстрикторами [29, 30]. Однако у некоторых сосудов дилатация в ответ на электростимуляцию происходила и в условиях отсутствия пресокращения. В частности, такая реакция наблюдалась у артериол *m. cremaster* хомяка, имевших значительный миогенный тонус [24]. Можно предположить, что наблюдавшееся в наших опытах преобладание дилататорной реакции на электростимуляцию ВСА крыс линии SHR по сравнению с WKY связано с более значительным исходным тонусом этой артерии у гипертензивных животных, так как известно, что при гипертензии миогенный тонус некоторых артерий повышен. В частности, это было показано на дуговой [31], коронарной [32], средней мозговой [33] и общей сонной [34] артерии крысы.

Ранее было продемонстрировано, что ослабление констрикторного и усиление дилататорного ответа кровеносных сосудов на электростимуляцию может быть обусловлено различными причинами, в том числе стимуляцией холинергических [29], NO-ергических [35] и CGRP-ергических нервов [30, 36], образованием супероксидного анион-радикала [25] и выделением простаглицина, а также NO из эндотелия [37]. Не исключено, что некоторые из указанных причин могут объяснять обнаруженное нами изменение реакции ВСА крыс линии SHR после нефрэктомии.

Следует отметить, что в отсутствие блокаторов калиевых каналов и ингибитора гуанилатциклазы статистически достоверное усиление нейрогенного ответа после нефрэктомии наблюдалось только у нормотензивных крыс и только для ВБА, у которой, в отличие от ВСА, нами было отмечено также усиление сократительного ответа на фенилэфрин, действующий через α_1 -адренорецепторы. Как известно, основным медиатором, обуславливающим нейрогенную сократительную реакцию ВБА крысы, является норадреналин [38], вызывающий вазоконстрикцию вследствие стимуляции постсинаптических α_1 -адренорецепторов. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что усиление нейрогенного ответа у ВБА крыс линии WKY связано с повышением концентрации и/или активности постсинаптиче-

ских $\alpha 1$ -адренорецепторов этой артерии после нефрэктомии нормотензивных крыс. Отсутствие изменения реакции на фенилэфрин после нефрэктомии, показанное в наших опытах на ВСА крыс линии WKY, было отмечено и ранее на общей сонной артерии крысы [39]. Разное действие нефрэктомии на разные сосуды было показано и другими авторами. В частности, в опытах на аорте и хвостовой артерии крысы [6] после нефрэктомии величина сократительного ответа на фенилэфрин на аорте возрастала, а на хвостовой артерии снижалась.

Итак, в нашем исследовании реакции ВСА на электростимуляцию с использованием блокаторов K^+ -каналов и ингибитора растворимой гуанилатциклазы впервые показано, что если у исходно нормотензивных крыс нефрэктомия способна вызывать увеличение сократительной способности артерий, то у исходно гипертензивных она вызывает уменьшение этой способности, что подтверждается большей величиной сокращения ВСА нефрэктомиванных крыс линии WKY на тетраэтиламмоний и меньшей у крыс линии SHR на тетраэтиламмоний и фенилэфрин. На ВБА эта закономерность проявлялась лишь отчасти и выражалась в большей величине сокращения на электростимуляцию в отсутствие блокаторов и при наличии глибенкламида, а также в большей величине сокращения на фенилэфрин у крыс WKY, но не SHR. Можно предположить, что уменьшение сократительной способности артерий у нефрэктомированных крыс SHR, особенно выраженное на ВСА, связано с чрезвычайно высоким значением АД (238 ± 2 мм рт. ст.) после нефрэктомии у изначально гипертензивных крыс. Это повышает вероятность инсульта вследствие высокого АД в областях мозга, лежащих выше ВСА, имеющей сниженную способность к сокращению, которое могло бы препятствовать росту АД в мозгу.

Полученные нами данные позволяют предположить, что в условиях снижения активности Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов большой проводимости, АТФ-чувствительных K^+ -каналов или растворимой гуанилатциклазы ХБП может приводить к усилению нейрогенного тонуса ВСА при нормотензии и к ослаблению этого тонуса при наличии гипертензии. Ослабление нейрогенного тонуса ВСА при ХБП в условиях гипертензии может способствовать возникновению инсульта.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, Neal B, Patrice HM, Okpechi I, Zhao MH, Lv J, Garg AX, Knight J, Rodgers A, Gallagher M, Kotwal S, Cass A, Perkovic V* (2015) Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet* 385(9981): 1975–1982. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)61601-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)61601-9)
2. *Fujii H, Kono K, Nishi S* (2019) Characteristics of coronary artery disease in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 23(6): 725–732. <https://doi.org/10.1007/s10157-019-01718-5>
3. *Kimura K* (2012) [Methylarginines-induced endothelial dysfunction in chronic kidney disease]. *Yakugaku Zasshi* 132(4): 443–448. <https://doi.org/10.1248/yakushi.132.443>
4. *Vallianou NG, Mitesh S, Gkogkou A, Geladari E* (2019) Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Is there Any Relationship? *Curr Cardiol Rev* 15(1): 55–63. <https://doi.org/10.2174/1573403x14666180711124825>

5. *Townsend RR* (2015) Arterial stiffness and chronic kidney disease: lessons from the Chronic Renal Insufficiency Cohort study. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 24(1): 47–53.
<https://doi.org/10.1097/mnh.0000000000000086>
6. *Spradley FT, White JJ, Paulson WD, Pollock DM, Pollock JS* (2013) Differential regulation of nitric oxide synthase function in aorta and tail artery from 5/6 nephrectomized rats. *Physiol Rep* 1(6): e00145.
<https://doi.org/10.1002/phy2.145>
7. *Li T, Gua C, Wu B, Chen Y* (2018) Increased circulating trimethylamine N-oxide contributes to endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* 495(2): 2071–2077.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.069>
8. *Hamzaoui M, Djerada Z, Brunel V, Mulder P, Richard V, Bellien J, Guerrot D* (2020) 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj mice. *Sci Rep* 10(1): 1524.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58393-w>
9. *Campbell NR, Lackland DT, Lisheng L, Niebylski ML, Nilsson PM, Zhang XH* (2015) Using the Global Burden of Disease study to assist development of nation-specific fact sheets to promote prevention and control of hypertension and reduction in dietary salt: a resource from the World Hypertension League. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 17(3): 165–167.
<https://doi.org/10.1111/jch.12479>
10. *Brown IAM, Diederich L, Good ME, DeLalio LJ, Murphy SA, Cortese-Krott MM, Hall JL, Le TH, Isakson BE* (2018) Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(9): 1969–1985.
<https://doi.org/10.1161/atvbaha.118.311229>
11. *Ma H, Chen SR, Chen H, Pan HL* (2019) Endogenous AT1 receptor-protein kinase C activity in the hypothalamus augments glutamatergic input and sympathetic outflow in hypertension. *J Physiol* 597(16): 4325–4340.
<https://doi.org/10.1113/jp278427>
12. *Goonetilleke L, Ralevic V, Dunn WR* (2013) Influence of pressure on adenosine triphosphate function as a sympathetic neurotransmitter in small mesenteric arteries from the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 31(2): 312–320.
<https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32835bd74d>
13. *Lataro RM, Silva MAB, Mestriner FL, Cau SBA, Tostes RCA, Salgado HC* (2019) Chronic Treatment With Acetylcholinesterase Inhibitors Attenuates Vascular Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens* 32(6): 579–587.
<https://doi.org/10.1093/ajh/hpz036>
14. *Ku E, Lee BJ, Wei J, Weir MR* (2019) Hypertension in CKD: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis* 74(1): 120–131.
<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2018.12.044>
15. *Thuraisingham RC, Raine AE* (1999) Maintenance of normal agonist-induced endothelium-dependent relaxation in uraemic and hypertensive resistance vessels. *Nephrol Dial Transplant* 14(1): 70–75.
<https://doi.org/10.1093/ndt/14.1.70>
16. *Иванова ГТ, Лобов ГИ, Береснева ОН, Парастаева ММ* (2019) Изменение реактивности сосудов крыс с экспериментальным уменьшением массы функционирующих нефронов. *Нефрология* 23(4): 88–95. [*Ivanova GT, Lobov GI, Beresneva ON, Parastaeva MM* (2019) Changes in the reactivity of rat vessels with an experimental decrease in the mass of functioning nephrons. *Nephrology* 23(4): 88–95. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.069>
17. *Dvoretzky DP, Yartsev VN, Karachentseva OV, Granstrem MP* (2000) Changes in reactivity of rat arteries subjected to dynamic stretch. *Acta Physiol Scand* 169(1): 13–19.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00693.x>
18. *Fujiwara H, Wake Y, Hashikawa-Hobara N, Makino K, Takatori S, Zamami Y, Kitamura Y, Kawasaki H* (2012) Endothelium-derived relaxing factor-mediated vasodilation in mouse mesenteric vascular beds. *J Pharmacol Sci* 118(3): 373–381.
<https://doi.org/10.1254/jphs.11197fp>
19. *Ozkan MH, Ozturk EI, Uma S* (2013) Electrical field stimulation (EFS)-induced relaxations turn into contractions upon removal of extracellular calcium in rat mesenteric artery. *Pharmacol Res* 70(1): 60–65.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.01.001>
20. *Martínez AC, Pagán RM, Prieto D, Recio P, García-Sacristán A, Hernández M, Benedito S* (2009) Modulation of noradrenergic neurotransmission in isolated rat radial artery. *J Pharmacol Sci* 111(3): 299–311.
<https://doi.org/10.1254/jphs.09135fp>

21. *Bao JX, Sjöjärne L* (1993) Dual contractile effects of ATP released by field stimulation revealed by effects of alpha,beta-methylene ATP and suramin in rat tail artery. *Br J Pharmacol* 110(4): 1421–1428. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13979.x>
22. *Fredricks KT, Liu Y, Rusch NJ, Lombard JH* (1994) Role of endothelium and arterial K⁺ channels in mediating hypoxic dilation of middle cerebral arteries. *Am J Physiol* 267(2 Pt 2): H580–H586. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.2.H580>
23. *Janigro D, Nguyen TS, Meno J, West GA, Winn HR* (1997) Endothelium-dependent regulation of cerebrovascular tone by extracellular and intracellular ATP. *Am J Physiol* 273(2 Pt 2): H878–H885. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.2.H878>
24. *Hammer LW, Ligon AL, Hester RL* (2001) Differential inhibition of functional dilation of small arterioles by indomethacin and glibenclamide. *Hypertension* 37(2 Pt 2): 599–603. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.37.2.599>
25. *Conde MV, Marín J, Balfagón G* (1999) Superoxide anion and K⁺ channels mediate electrical stimulation-induced relaxation in the rat basilar artery. *Eur J Pharmacol* 372(2): 179–186. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00215-0](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00215-0)
26. *Pagán RM, Martínez AC, Martínez MP, Hernández M, García-Sacristán A, Correa C, Prieto D, Benedito S* (2009) Endothelial and potassium channel dependent modulation of noradrenergic vasoconstriction in the pig radial artery. *Eur J Pharmacol* 616(1-3): 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.002>
27. *Huang Y, Chan NW* (1998) Involvement of endothelium in relaxant action of glibenclamide on the rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* 343(1): 27–33. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)01516-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)01516-1)
28. *Rosenblum WI* (2003) ATP-sensitive potassium channels in the cerebral circulation. *Stroke* 34(6): 1547–1552. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000070425.98202.b5>
29. *Van Riper DA, Bevan JA* (1992) Electrical field stimulation-mediated relaxation of rabbit middle cerebral artery. Evidence of a cholinergic endothelium-dependent component. *Circ Res* 70(6): 1104–1112. <https://doi.org/10.1161/01.res.70.6.1104>
30. *Norton CE, Grunz-Borgmann EA, Hart ML, Jones BW, Franklin CL, Boerman EM* (2021) Role of perivascular nerve and sensory neurotransmitter dysfunction in inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 320(5): H1887–H1902. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00037.2021>
31. *Nademi S, Lu C, Dickhout JG* (2020) Enhanced Myogenic Constriction in the SHR Preglomerular Vessels Is Mediated by Thromboxane A2 Synthesis. *Front Physiol* 11: 853. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00853>
32. *Choi SK, Lim M, Byeon SH, Lee YH* (2016) Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves coronary artery function in the spontaneously hypertensive rats. *Sci Rep* 6: 31925. <https://doi.org/10.1038/srep31925>
33. *Szarka N, Amrein K, Horvath P, Ivic I, Czeiter E, Buki A, Koller A, Toth P* (2017) Hypertension-Induced Enhanced Myogenic Constriction of Cerebral Arteries Is Preserved after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 34(14): 2315–2319. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4962>
34. *Shimamura K, Zhou M, Ito Y, Kimura S, Zou LB, Sekiguchi F, Kitamura K, Sunano S* (2002) Effects of flufenamic acid on smooth muscle of the carotid artery isolated from spontaneously hypertensive rats. *J Smooth Muscle Res* 38(1–2): 39–50. <https://doi.org/10.1540/jsmr.38.39>
35. *Xavier FE* (2020) Nitrergic perivascular innervation in health and diseases: Focus on vascular tone regulation. *Acta Physiol (Oxf)* 230(1): e13484. <https://doi.org/10.1111/apha.13484>
36. *Telli G, Tel BC, Gümüşel B* (2020) The Cardiopulmonary Effects of the Calcitonin Gene-related Peptide Family. *Turk J Pharm Sci* 17(3): 349–356. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2019.47123>
37. *Sheng Y, Zhu L* (2018) The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 10(1): 17–28.
38. *Blanco-Rivero J, Couto GK, Paula SM, Fontes MT, Rossoni LV* (2021) Enhanced sympathetic neurotransduction in the superior mesenteric artery in a rat model of heart failure: role of noradrenaline and ATP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 320(2): H563–H574. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00444.2020>
39. *Köhler R, Eichler I, Schönfelder H, Grgic I, Heinau P, Si H, Hoyer J* (2005) Impaired EDHF-mediated vasodilation and function of endothelial Ca-activated K channels in uremic rats. *Kidney Int* 67(6): 2280–2287. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00331.x>

Effects of Nephrectomy on the Electrical Field Stimulation-Evoked Changes in Tone of Arteries from the Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats

V. N. Yartsev*

Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

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

The effects of nephrectomy on the electrical field stimulation-evoked changes in tone of Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rat (SHR) superior mesenteric artery (SMA) and internal carotid artery (ICA) segments were studied. The hypothesis that chronic kidney disease (CKD) leads to an increase in neurogenic vascular tone in both normal and hypertensive animals was tested. 5/6 nephrectomy in the rats was used as a model of CKD. Neurogenic constriction of the segments was induced by the electrical field stimulation of the perivascular nerves in the absence and presence of potassium channels blockers (tetraethylammonium, glibenclamide) or methylene blue, a guanylyl-cyclase inhibitor. In the absence of blockers, nephrectomy was found to increase neurogenic contraction only in SMA from WKY. In addition, in SMA, this effect of nephrectomy was manifested in the presence of glibenclamide. In the presence of blockers, the neurogenic response of the SMA from SHR did not depend on nephrectomy, while in ICA from nephrectomized rats under these conditions, neurogenic constriction in WKY and dilatation in SHR was more significant than in control animals. Nephrectomy-related increase in artery constriction in WKY was also evoked by phenylephrine in SMA and tetraethylammonium in ICA, while in SHR, nephrectomy led to a decrease in ICA constriction evoked by phenylephrine and tetraethylammonium. The data obtained suggest that CKD may lead to an increase in neurogenic and chemical-induced vascular tone in normotensive animals and to its decrease in initially hypertensive animals. To the greatest extent, these changes can be expressed in the ICA and are associated with an increase in the activity of potassium channels and guanylate cyclase in this artery in CKD in initially normotensive animals and with a decrease in this activity in initially hypertensive animals.

Keywords: internal carotid artery, neurogenic constriction, nephrectomy, superior mesenteric artery, SHR, WKY

**ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЕРДЦА КРЫС В ПЕРИОД
РЕПОЛЯРИЗАЦИИ ЖЕЛУДОЧКОВ ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО БЕГА
НА ТРЕДБАНЕ ДО ОТКАЗА**

© 2022 г. А. Г. Ивонин^{1, *}, С. Л. Смирнова¹, И. М. Рощевская²

¹Федеральный исследовательский центр Коми научный центр Уральского отделения
Российской академии наук, Сыктывкар, Россия

²Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, Россия

*E-mail: alexivonin@mail.ru

Поступила в редакцию 07.08.2022 г.

После доработки 06.09.2022 г.

Принята к публикации 09.09.2022 г.

Работа посвящена исследованию электрической активности сердца крыс в период реполяризации желудочков после однократного принудительного бега до отказа. Электрофизиологические свойства миокарда изучали методами традиционной ЭКГ и поверхностного ЭКГ-картирования. Кардиоэлектрические потенциалы у крыс, наркотизированных зоветилом, регистрировали за 3–5 сут до (исходное состояние) и через 5, 10, 20 и 30 мин после бега на тредбане до отказа. По сравнению с исходным состоянием у крыс через 5 мин после физической нагрузки до отказа было показано увеличение длительности интервалов QT_{II}, JT_{II} и Tpeak-Tend_{II}, более раннее начало и более позднее завершение, а также увеличение продолжительности реполяризации желудочков на эквивалентных картах распределения потенциалов электрического поля сердца (ЭПС) на поверхности тела. Спустя 10 мин после бега до отказа временные параметры электрической активности сердца возвращались к исходным значениям. Изменения амплитудных характеристик ЭКГ_{II} (депрессия сегмента ST, снижение амплитуды T-волны) и ЭПС на поверхности тела (снижение максимальных амплитуд положительного и отрицательного экстремумов в период реполяризации желудочков) обнаруживались через 5–10 мин и сохранялись до 20–30 мин после бега до отказа. Выявлена положительная корреляционная связь между изменениями максимальной амплитуды отрицательного экстремума ЭПС на поверхности грудной клетки и изменениями амплитуды T_{II}-волны в анализируемые периоды времени после физической нагрузки до отказа. Сделано предположение, что обнаруженные изменения электрической активности сердца в период реполяризации желудочков у крыс после принудительного бега на тредбане были обусловлены ишемическим повреждением миокарда, индуцированным выполнением ишающей физической нагрузки.

Ключевые слова: крысы, тредбан, бег до отказа, реполяризация желудочков, поверхностное ЭКГ-картирование

DOI: 10.31857/S0869813922100089

Регулярная физическая активность является важным компонентом профилактики и лечения большинства сердечно-сосудистых заболеваний [1] и связана со снижением общей и кардиоваскулярной смертности [2]. В то же время избыточные физические нагрузки могут оказывать негативное влияние на сердце. Высокие

уровни физических нагрузок увеличивают риск развития жизнеугрожающих желудочковых аритмий, острого инфаркта миокарда и внезапной сердечной смерти у предрасположенных лиц [3]. Длительные интенсивные физические нагрузки могут приводить к повышению уровня циркулирующих сердечных тропонинов и временному снижению функции миокарда у практически здоровых людей [4].

Для моделирования предельных (истощающих) физических нагрузок у лабораторных животных используют бег на тредбане или принудительное плавание до отказа [5, 6]. Выполнение крысами физической нагрузки до отказа приводит к гипоксически-ишемическому повреждению миокарда вследствие быстрого усиления насосной деятельности сердца и перераспределения сердечного кровотока [7]. После физической нагрузки до отказа у крыс выявлены изменения ультраструктуры кардиомиоцитов, увеличение концентрации маркеров повреждения миокарда в сыворотке крови, нарушение сердечного метаболизма [8], ослабление систолической и диастолической функций левого желудочка [9].

Функциональное состояние сердца отражается на его электрофизиологических свойствах. Процесс реполяризации (восстановления возбудимости) миокарда высокочувствителен к действию различных факторов [10], включая физические нагрузки [11]. У лабораторных животных анализ электрических процессов в сердце в период реполяризации желудочков после физической нагрузки до отказа проводится по показателям ЭКГ в отведениях от конечностей (амплитуде сегмента ST и T-волны) [7, 12]. Вместе с тем изменения на ЭКГ в стандартных отведениях в период реполяризации миокарда желудочков не обладают высокой специфичностью, однотипная картина изменений ST-сегмента и T-волны может наблюдаться при различных функциональных состояниях сердца [13]. Поверхностное ЭКГ-картирование, основанное на синхронной регистрации кардиоэлектрических потенциалов от множества отведений на поверхности грудной клетки, является перспективным неинвазивным методом исследования биоэлектрических процессов в миокарде, позволяет проводить более сложный и обширный анализ по сравнению со стандартной ЭКГ [14, 15]. Чувствительность и специфичность многоканального поверхностного ЭКГ-картирования выше, чем у ЭКГ в общепринятых отведениях [16]. С помощью метода поверхностного картирования ЭКГ-сигналов ранее были выявлены существенные изменения электрических свойств миокарда у крыс при экспериментальном моделировании патологий сердечно-сосудистой системы [17, 18].

Цель настоящей работы – исследовать электрическую активность сердца крыс в период реполяризации желудочков после однократного бега на тредбане до отказа с использованием традиционной электрокардиографии и картирования кардиоэлектрических потенциалов на поверхности тела.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на самцах нелинейных белых крыс (возраст 12 недель, масса 267 ± 24 г), полученных в филиале “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства” (п. Столбовая, Россия). Крысы содержались в стандартных условиях вивария при режиме 12 ч свет/12 ч темнота и температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ в групповых клетках и получали стандартный коммерческий корм для грызунов и питьевую воду без ограничений. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”.

Для моделирования физической нагрузки использовали моторизованный тредбан для грызунов (Panlab/Harvard Apparatus, Испания) с системой управления,

позволяющей задавать необходимой уровень нагрузки. Крыс приучали к бегу на тредбане в течение трех суток подряд по 10 мин/сутки при постепенном увеличении скорости от 12 до 36 м/мин и наклоне дорожки 0°. Для стимуляции бега применяли удары электрическим током (0.5 мА) от электропроводящей решетки, расположенной в заднем конце тредбана. Животных, проявивших способность к бегу во время ознакомительных тренировок, отбирали для использования в тесте с физической нагрузкой до отказа. В день тестирования крыс подвергали бегу до отказа при скорости 36 м/мин и 0° угле наклона дорожки. Критерием отказа [19] являлась неспособность крыс продолжать бег против движущейся ленты тредбана, несмотря на электростимуляцию. Из 24 крыс, участвующих в ознакомительных тренировках, для теста с физической нагрузкой до отказа были отобраны 20 животных. Продолжительность бега этих крыс до момента отказа составила 19.5 ± 5.6 мин.

Электрическую активность сердца крыс регистрировали за три–пять суток до (исходное состояние) и через 5, 10, 20 и 30 мин после бега до отказа. Животных наркотизировали золетилом (Virbas, Франция) в дозе 3.5 мг/100 г массы тела (внутримышечно) и располагали лежа на спине. Регистрацию униполярных ЭКГ осуществляли от 64 (в исходном состоянии) или 32 (после бега до отказа) подкожных игольчатых электродов, равномерно распределенных вокруг грудной клетки. Синхронно с униполярными ЭКГ с поверхности тела регистрировали ЭКГ в стандартных (биполярных) отведениях от конечностей. Данные записывали с помощью многоканальной автоматизированной системы (разрешение 16 бит, полоса пропускания 0.05–1000 Гц, частота дискретизации сигнала 4000 Гц). Период от трех до пяти суток между записью ЭКГ-сигналов в исходном состоянии и бегом до отказа служил для восстановления животных после общей анестезии. Для регистрации электрической активности сердца после выполнения физической нагрузки крыс наркотизировали сразу же после отказа от бега и снятия с ленты тредбана.

На ЭКГ во II отведении от конечностей (ЭКГ_{II}) по трем кардиоциклам измеряли длительность интервалов R-R, QT, JT, J-Tpeak и Tpeak-Tend, амплитуду S-зубца и T-волны. По длительности R-R интервалов рассчитывали частоту сердечных сокращений (ЧСС). Амплитуду S-зубца рассматривали в качестве амплитуды сегмента ST [20].

На основе туловищных ЭКГ строили эквипотенциальные моментные карты, отражающие распределение потенциалов электрического поля сердца (ЭПС) в каждый заданный момент кардиоцикла на развертке поверхности тела на плоскость прямоугольника. По эквипотенциальным моментным картам определяли моменты начала и завершения реполяризации желудочков (о начале реполяризации судили по характерному паттерну пространственного распределения потенциалов ЭПС на поверхности грудной клетки, о завершении реполяризации – по наибольшему снижению амплитуд потенциалов ЭПС), продолжительность периода реполяризации желудочков, максимальные амплитуды положительного и отрицательного экстремумов кардиоэлектрических потенциалов, время достижения экстремумами максимальных амплитуд. Отсчет времени (в мс) осуществляли относительно пика R-зубца на ЭКГ_{II}.

Статистический анализ данных проводили с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, OK, США). При определении временных параметров ЭКГ_{II} и временных характеристик ЭПС на поверхности тела учитывали животных ($n = 14$), у которых нисходящая фаза T-волны на ЭКГ в отведениях от конечностей и туловищных отведениях пересекалась с изоэлектрической линией (уровнем сегмента PQ); крыс, у которых T-волна наслаивалась на R-волну последующего кардиоцикла до достижения изолинии, не учитывали. При анализе амплитудных параметров ЭКГ_{II} и амплитудных характеристик ЭПС на поверхности тела объем вы-

Таблица 1. Параметры ЭКГ у крыс в исходном состоянии и после бега до отказа

Параметры	Исходное состояние	Период после бега до отказа (мин)			
		5	10	20	30
ЧСС, уд./мин	485 ± 22	479 ± 21	491 ± 22	489 ± 26	491 ± 23
QT _{II} , мс	62.5 ± 3.5	65.1 ± 3.2*	64.1 ± 3.7	64.2 ± 4.4	63.2 ± 3.7
JT _{II} , мс	46.6 ± 3.5	50.0 ± 3.6**	48.6 ± 3.9	48.4 ± 4.8	47.9 ± 4.2
J-Треак _{II} , мс	18.5 ± 2.2	18.9 ± 3.1	18.6 ± 3.1	18.4 ± 2.9	18.9 ± 3.4
Треак-Tend _{II} , мс	28.1 ± 3.3	31.1 ± 2.5**	30.0 ± 3.8	29.8 ± 3.7	28.8 ± 3.0
ST _{II} сегмент, мВ	-0.28 ± 0.15	-0.35 ± 0.18***	-0.35 ± 0.19***	-0.37 ± 0.19***	-0.35 ± 0.19***
T _{II} -волна, мВ	0.19 ± 0.05	0.17 ± 0.06*	0.16 ± 0.06***	0.17 ± 0.05*	0.18 ± 0.05

Данные представлены как средняя арифметическая ± стандартное отклонение. Различия значимы по сравнению с исходным состоянием. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, критерий Даннета.

борки составлял 20 животных ($n = 20$). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. При нормальном распределении данных для сравнения средних значений одного и того же параметра в различные периоды времени применяли дисперсионный анализ для повторных измерений (RM-ANOVA). В случае выявления значимого влияния фактора времени на изучаемый параметр проводили апостериорный анализ (post hoc test) с помощью критерия Даннета, сравнивая значения параметра в каждый период измерения после бега до отказа с таковым в исходном состоянии. Если распределение данных отличалось от нормального, для сравнения переменных использовали непараметрический критерий Фридмана. Данные с нормальным распределением представлены в виде средней арифметической ± стандартное отклонение. Данные с распределением, отличным от нормального, приведены в виде медианы, первого и третьего квартилей. Взаимосвязь между показателями оценивали при помощи коэффициента корреляции Пирсона (r). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Параметры ЭКГ_{II} у крыс в исходном состоянии и в анализируемые периоды времени после принудительного бега до отказа представлены в табл. 1. Значения ЧСС до и после бега до отказа значимо не различались ($F_{4, 52} = 2.49, p > 0.05$, RM-ANOVA). Наблюдалось влияние фактора времени на длительность интервалов QT_{II}, JT_{II} и Треак-Tend_{II} ($F_{4, 52} = 2.70, p = 0.04$ для QT_{II}, $F_{4, 52} = 3.94, p < 0.01$ для JT_{II} и $F_{4, 52} = 4.18, p < 0.01$ для Треак-Tend_{II} интервала). Апостериорный анализ показал увеличение длительности вышеперечисленных интервалов ЭКГ через 5 мин после бега до отказа относительно исходного состояния ($p = 0.01$ для QT_{II}, $p < 0.01$ для JT_{II} и $p < 0.01$ для Треак-Tend_{II} интервала). Длительность интервала J-Треак_{II} до и после бега практически не различалась ($F_{4, 52} = 0.36, p > 0.05$, RM-ANOVA).

Значительный эффект времени был обнаружен для амплитудных параметров ЭКГ ($F_{4, 76} = 14.83, p < 0.001$ для амплитуды сегмента ST_{II} и $F_{4, 76} = 4.76, p = 0.02$ для амплитуды T_{II}-волны, RM-ANOVA). Амплитуда сегмента ST_{II} во все периоды измерения (5, 10, 20, 30 мин) после бега до отказа была больше, чем в исходном состоянии ($p < 0.001$ для всех парных сравнений, критерий Даннета). По сравнению с исходной величиной, амплитуда T_{II}-волны была меньше через 5 ($p = 0.02$), 10 ($p < 0.001$) и 20 мин ($p = 0.01$) после бега до отказа (критерий Даннета). Корреляционный анализ показал отсутствие статистически значимой взаимосвязи между изменением

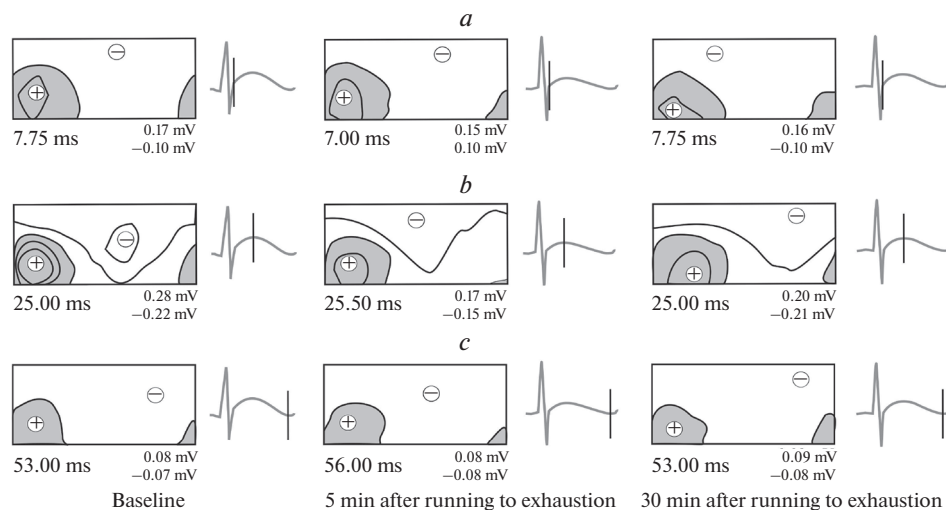


Рис. 1. Пространственное распределение кардиоэлектрических потенциалов на поверхности тела крысы (№ 13) в период реполяризации желудочков в исходном состоянии, через 5 и 30 мин после бега до отказа. а – начало T_{II} -волны; б – вершина T_{II} -волны; с – окончание T_{II} -волны. Показаны области положительных (закрашены) и отрицательных кардиопотенциалов. Знаки плюс и минус обозначают местоположение положительного и отрицательного экстремумов соответственно. Под каждой картой указано время относительно пика R_{II} -зубца, представлены амплитуды положительного и отрицательного экстремумов. Справа от каждой карты приведена ЭКГ с маркером времени (вертикальная черта). Шаг изолиний равен 0.1 мВ. Левая половина каждой карты соответствует вентральной стороне тела, правая – дорсальной.

амплитуд сегмента ST_{II} и T_{II} -волны в анализируемые периоды времени после бега до отказа относительно исходного состояния ($r = 0.06-0.18$, $p = 0.45-0.79$).

Пространственное распределение кардиоэлектрических потенциалов на поверхности грудной клетки в период реполяризации желудочков у крыс после физической нагрузки до отказа было схожим с таковым в исходном состоянии (рис. 1). Формирование на поверхности тела ЭПС, характерного для реполяризации желудочков, происходило в период, соответствующий переходу восходящей части S-зубца в T-волну на ЭКГ_{II}. При этом область положительных кардиопотенциалов с экстремумом располагалась в каудальной части вентральной поверхности грудной клетки. Область отрицательных потенциалов занимала всю остальную поверхность грудной клетки, отрицательный экстремум чаще находился на дорсальной поверхности грудной клетки в ее краниальной трети. Такое расположение областей и экстремумов кардиопотенциалов на поверхности тела сохранялось на протяжении всего периода реполяризации желудочков сердца (о завершении процесса реполяризации свидетельствовало наибольшее уменьшение амплитуд потенциалов ЭПС, которое практически соответствовало окончанию T-волны на ЭКГ_{II}).

Статистический анализ выявил значимое влияние фактора времени на моменты начала и завершения периода реполяризации желудочков ($F_{4, 52} = 12.29$, $p < 0.001$ и $F_{4, 52} = 9.36$, $p < 0.01$ соответственно, RM-ANOVA), а также на длительность реполяризации желудочков на эквипотенциальных картах распределения потенциалов ЭПС на поверхности тела ($F_{4, 76} = 11.83$, $p < 0.001$, RM-ANOVA). Post hoc тест пока-

Таблица 2. Временные параметры ЭПС на поверхности тела в период реполяризации желудочков у крыс в исходном состоянии и после бега до отказа

Параметры	Исходное состояние	Период после бега до отказа (мин)			
		5	10	20	30
Момент начала реполяризации желудочков, мс	6.5 ± 1.4	5.9 ± 1.3***	6.4 ± 1.4	6.6 ± 1.3	6.5 ± 1.4
Момент завершения реполяризации желудочков, мс	57.4 ± 5.9	61.3 ± 3.4***	57.9 ± 4.0	56.4 ± 4.5	56.3 ± 4.0
Длительность реполяризации желудочков, мс	50.9 ± 6.0	55.5 ± 3.4***	51.5 ± 4.1	49.8 ± 4.5	49.8 ± 4.3

Данные представлены как средняя арифметическая ± стандартное отклонение. Различия значимы по сравнению с исходным состоянием. *** $p < 0.001$, критерий Даннета.

зал, что процесс реполяризации желудочков у крыс через 5 мин после бега до отказа начинался значимо раньше ($p < 0.001$) и завершался значимо позже ($p < 0.001$), чем в исходном состоянии (табл. 2). Длительность реполяризации желудочков у крыс через 5 мин после бега до отказа значимо превышала таковую в исходном состоянии ($p < 0.001$) (табл. 2).

Амплитуды положительного и отрицательного экстремумов кардиопотенциалов на поверхности тела крыс в период реполяризации желудочков постепенно увеличивались, достигая максимальных значений около вершины T_{II} -волны, после чего уменьшались. Наблюдалось значительное влияние фактора времени на максимальную амплитуду экстремумов за период реполяризации желудочков ($F_{4, 76} = 25.06$, $p < 0.001$ для положительного и $F_{4, 76} = 5.87$, $p < 0.01$ для отрицательного экстремума, RM-ANOVA). Максимальная амплитуда положительного экстремума во все периоды измерения после бега до отказа была значимо меньше, чем в исходном состоянии ($p < 0.001$ для каждого парного сравнения) (рис. 2). По сравнению с исходным значением максимальная амплитуда отрицательного экстремума была значимо меньше через 10 ($p < 0.001$) и 20 мин ($p < 0.01$) после бега до отказа (рис. 2).

Статистически значимая прямая взаимосвязь была установлена между изменением максимальной амплитуды отрицательного экстремума ЭПС на поверхности тела и изменением амплитуды T_{II} -волны в анализируемые периоды времени после бега до отказа относительно исходного состояния (табл. 3). Значимая связь между изменением максимальной амплитуды положительного экстремума и изменением амплитуды T_{II} -волны в различные периоды времени после бега до отказа отсутствовала (табл. 3). Время достижения экстремумами ЭПС максимальных амплитуд до и после бега до отказа значимо не различалось ($\chi^2 = 6.26$, $df = 4$, $p > 0.05$ для положительного и $\chi^2 = 7.19$, $df = 4$, $p > 0.05$ для отрицательного экстремума, критерий Фридмана) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Принудительный бег на тредбане вызывает у грызунов мощный метаболический стресс, требующий значительного увеличения доставки кислорода к работающим мышцам [21]. Реакцией сердечно-сосудистой системы крыс на принудительную беговую нагрузку является увеличение ЧСС [22], обеспечивающее возрастание сердечного выброса. Учащение сердечного ритма у крыс во время бега на тредбане в значительной степени определяется деятельностью автономной нервной системы, в особенности активацией симпатических кардиотропных влияний [23]. Снижение ЧСС после прекращения физической нагрузки связывают с вагусной реак-

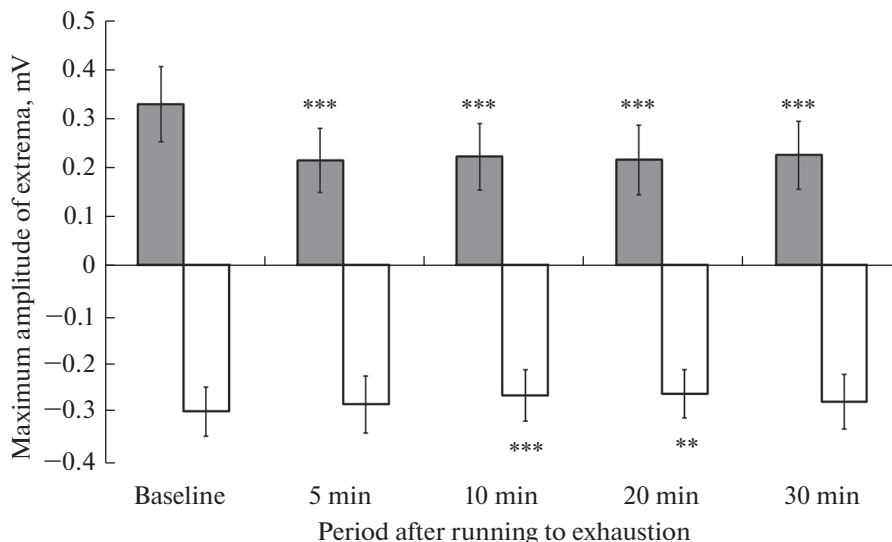


Рис. 2. Максимальная амплитуда положительного (темная заливка) и отрицательного (светлая заливка) экстремумов ЭПС на поверхности тела в период реполяризации желудочков у крыс в исходном состоянии и после бега до отказа. Данные представлены как средняя арифметическая \pm стандартное отклонение. Различия значимы по сравнению с исходным состоянием. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, критерий Даннета.

тивацией [24]. У нетренированных крыс линии Вистар величина ЧСС во время бега до отказа повышалась от 427 до 595 уд./мин и снижалась до исходного уровня спустя 10 мин после окончания бега [25]. В нашем исследовании в анализируемые периоды времени (5, 10, 20 и 30 мин) после бега до отказа ЧСС не отличалась от таковой до бега, что связывали с ее восстановлением до исходного уровня в течение первых 5 мин после прекращения физической нагрузки.

На фоне отсутствия изменений ЧСС у крыс после бега до отказа наблюдали обратимое увеличение длительности отдельных составляющих кардиоцикла (интервалов QT, JT и Tpeak-Tend) относительно исходного состояния. Длительность интервала QT, отражающего общее время де- и реполяризации желудочков сердца, во время физической нагрузки сокращается по мере увеличения ЧСС [13, 26]. Отсутствие укорочения интервала QT при физической нагрузке рассматривается в качестве маркера ишемии миокарда [27]. Интервал JT отражает непосредственно процесс реполяризации миокарда желудочков [28], при физической нагрузке наблюдается уко-

Таблица 3. Взаимосвязь изменений максимальной амплитуды положительного (dMax) и отрицательного (dMin) экстремумов ЭПС на поверхности тела в период реполяризации желудочков с изменением амплитуды T_{II}-волны (dT_{II}) у крыс в анализируемые периоды времени после бега до отказа относительно исходного состояния

Показатель	Период после бега до отказа (мин)							
	5		10		20		30	
	r	p	r	p	r	p	r	p
dMax, мВ–dT _{II} , мВ	0.31	0.19	0.41	0.07	0.26	0.26	0.38	0.10
dMin, мВ–dT _{II} , мВ	0.71	<0.01	0.79	<0.001	0.85	<0.001	0.82	<0.001

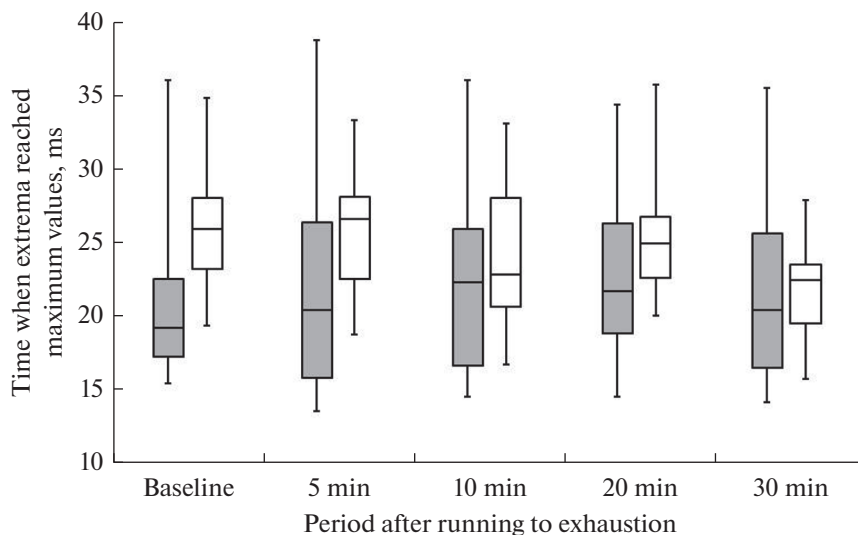


Рис. 3. Момент достижения положительным (темная заливка) и отрицательным (светлая заливка) экстремумами ЭПС на поверхности тела максимальных амплитуд в период реполяризации желудочков у крыс в исходном состоянии и после бега до отказа. Нижняя и верхняя граница каждого прямоугольника – первый и третий квартили соответственно; поперечная линия внутри – медиана; концы отрезков – минимум и максимум соответственно.

рочение данного интервала [29]. В исследованиях на экспериментальных животных выявлена пролонгация интервала JT при доксорубин-индуцируемом повреждении сердца [30], ишемии-реперфузии миокарда [31]. Длительность интервала Tpeak-Tend коррелирует с глобальной дисперсией реполяризации, удлинение интервала свидетельствует о повышенной неоднородности реполяризации желудочков и является предиктором жизнеугрожающих аритмий и внезапной сердечной смерти при ишемической болезни сердца и других патологических состояниях [32]. Выявленное нами увеличение длительности интервалов QT_{II}, JT_{II} и Tpeak-Tend_{II} у крыс через 5 мин после бега до отказа могло быть проявлением транзиторной ишемии миокарда и косвенно указывало на повышение риска неблагоприятных кардиальных событий у животных при выполнении истощающей физической нагрузки.

Депрессия ST сегмента на ЭКГ человека при физической нагрузке служит маркером преходящей ишемии миокарда [11, 33]. У взрослых крыс изоэлектрический сегмент ST на ЭКГ отсутствует, что связывают с кратковременностью фазы медленной реполяризации на внутриклеточном потенциале действия рабочих кардиомиоцитов желудочков вследствие высокой плотности выходящего калиевого тока I_{to} [34]. Депрессию сегмента ST на ЭКГ крыс предложено оценивать по увеличению амплитуды S-зубца [20, 35]. В исследованиях на человеке показано, что амплитуда T-волны на ЭКГ увеличивается сразу после завершения физической нагрузки [11]. Снижение амплитуды (уплощение) T-волны на ЭКГ после нагрузочного тестирования может указывать на ишемию миокарда [13]. Уплощение T-волны в сочетании с депрессией ST сегмента было обнаружено на ЭКГ крыс линии Вистар после ежедневного, в течение семи суток, принудительного плавания до отказа [12]. Таким образом, депрессия сегмента ST_{II} и снижение амплитуды T_{II}-волны у крыс после бега до отказа в настоящем исследовании могли быть результатом гипоксически-ишемического повреждения миокарда желудочков, возникающего след-

ствии неспособности коронарных сосудов удовлетворить возросшие потребности сердечной мышцы в кислороде. Корреляционный анализ свидетельствовал о низкой сопряженности изменений амплитуды сегмента ST_{II} и T_{II}-волны в анализируемые периоды времени после бега до отказа.

Пространственное распределение кардиоэлектрических потенциалов на поверхности грудной клетки в период T-волны ЭКГ отражает последовательность восстановления возбудимости желудочков сердца [36], обусловленную, в свою очередь, распределением локальных длительностей реполяризации [37]. В нашем исследовании расположение областей кардиопотенциалов, положительного и отрицательного экстремумов ЭПС на поверхности тела крыс в период реполяризации желудочков после бега до отказа существенно не изменялось и соответствовало таковому, описанному ранее у взрослых крыс линии Вистар [36].

Анализ ЭПС на поверхности тела выявил изменения временных характеристик электрической активности миокарда у крыс через 5 мин после бега до отказа: более раннее начало и более позднее завершение реполяризации желудочков, увеличение продолжительности периода реполяризации желудочков. Известно, что физические нагрузки могут вызывать уменьшение длительности деполяризации (возбуждения) желудочков сердца, что отражается на ЭКГ в виде укорочения комплекса QRS [38]. В представленной работе более раннее начало реполяризации на эквивалентных картах у крыс после бега до отказа сопровождалось уменьшением длительности комплекса QRS на ЭКГ_{II} (данные не представлены), и поэтому могло быть обусловлено изменением продолжительности возбуждения миокарда желудочков. Более позднее завершение периода реполяризации желудочков на эквивалентных картах у крыс после истощающей физической нагрузки до отказа свидетельствовало о замедлении процесса восстановления возбудимости кардиомиоцитов желудочков, связываемом нами с преходящей ишемией сердечной мышцы.

В немногочисленных работах анализировалось влияние физических нагрузок на амплитудные характеристики ЭПС на поверхности тела человека в период реполяризации желудочков. По данным одних авторов, максимальная амплитуда положительного экстремума кардиоэлектрических потенциалов в период T-волны у здоровых испытуемых после нагрузочной пробы повышалась на 30–260% по сравнению с состоянием покоя [39]. Другие исследователи не выявили выраженных изменений максимальной и минимальной амплитуд кардиопотенциалов на поверхности тела здоровых испытуемых в момент пика T-волны реперной ЭКГ после нагрузочного тестирования [40]. На основании сопоставления параметров ЭПС на поверхности грудной клетки у здоровых лиц и больных с ишемической болезнью сердца снижение амплитуды T-волны в прекардиальных отведениях после физической нагрузки было предложено рассматривать в качестве маркера транзиторной ишемии миокарда [41]. Выявленное нами уменьшение максимальных амплитуд положительного и отрицательного экстремумов ЭПС на поверхности тела в период реполяризации желудочков у крыс после бега до отказа могло быть следствием значительной гипоксии нагрузки, приведшей к ишемии миокарда желудочков. Прямая корреляционная связь между изменениями амплитуды T_{II}-волны и изменениями максимальной амплитуды отрицательного экстремума ЭПС в анализируемые периоды времени после бега до отказа косвенно подтверждала ишемическое происхождение последних.

Таким образом, у ранее нетренированных крыс после однократного бега на тредбане до отказа выявлены изменения временных и амплитудных параметров ЭКГ_{II} и ЭПС на поверхности тела, характеризующих процесс реполяризации желудочков. При этом изменения временных параметров электрической активности

сердца обнаруживались через 5 мин и исчезали через 10 мин после бега до отказа, а амплитудных — выявлялись спустя 5–10 мин и сохранялись до 20–30 мин после бега до отказа. Большая часть из обнаруженных изменений электрофизиологических характеристик миокарда, предположительно, была обусловлена гипоксически-ишемическим повреждением сердечной мышцы, индуцированным истощающей физической нагрузкой. Использование метода поверхностного ЭКГ-картирования у крыс после воздействия физической нагрузки до отказа позволило выявить изменения электрической активности миокарда в начальную фазу реполяризации желудочков, не находящие отражения на ЭКГ во II отведении от конечностей.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств государственного задания АААА-А18-118012390260-9.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (А.Г.И., С.Л.С., И.М.Р.), получение экспериментальных данных (А.Г.И., С.Л.С., И.М.Р.), обработка результатов, написание рукописи статьи (А.Г.И.), доработка рукописи статьи (И.М.Р.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pinckard K, Baskin KK, Stanford KI* (2019) Effects of exercise to improve cardiovascular health. *Front Cardiovasc Med* 6: 69. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00069>
2. *Nocon M, Hiemann T, Müller-Riemenschneider F, Thalau F, Roll S, Willich SN* (2008) Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15(3): 239–246. <https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e3282f55e09>
3. *Franklin BA, Thompson PD, Al-Zaiti SS, Albert CM, Hivert MF, Levine BD, Lobelo F, Madan K, Sharrief AZ, Eijsvogels T, American Heart Association Physical Activity Committee of the Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; and Stroke Council* (2020) Exercise-Related Acute Cardiovascular Events and Potential Deleterious Adaptations Following Long-Term Exercise Training: Placing the Risks Into Perspective—An Update: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 141(13): e705–e736. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000749>
4. *Whyte GP* (2008) Clinical significance of cardiac damage and changes in function after exercise. *Med Sci Sports Exerc* 40(8): 1416–1423. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318172cefd>
5. *Zaretsky DV, Kline H, Zaretskaia MV, Rusyniak DE* (2018) Automatic analysis of treadmill running to estimate times to fatigue and exhaustion in rodents. *Peer J* 6: e5017. <https://doi.org/10.7717/peerj.5017>
6. *Wang CC, Ding L, Zhang LY, Shi HH, Xue CH, Chi NQ, Yanagita T, Zhang TT, Wang YM* (2020) A pilot study on the effects of DHA/EPA-enriched phospholipids on aerobic and anaerobic exercises in mice. *Food Funct* 11(2): 1441–1454. <https://doi.org/10.1039/c9fo02489a>
7. *Su Y, Wang Y, Xu P, Sun Y, Ping Z, Huang H, Cao X* (2021) Study on the time-effectiveness of exercise preconditioning on heart protection in exhausted rats. *Chin J Physiol* 64(2): 97–105. https://doi.org/10.4103/CJP.CJP_65_20
8. *Ping Z, Zhang LF, Cui YJ, Chang YM, Jiang CW, Meng ZZ, Xu P, Liu HY, Wang DY, Cao XB* (2015) The Protective Effects of Salidroside from Exhaustive Exercise-Induced Heart Injury by Enhancing the PGC-1 β -NRF1/NRF2 Pathway and Mitochondrial Respiratory Function in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2015: 876825. <https://doi.org/10.1155/2015/876825>
9. *Li Y, Xu P, Wang Y, Zhang J, Yang M, Chang Y, Zheng P, Huang H, Cao X* (2020) Different Intensity Exercise Preconditions Affect Cardiac Function of Exhausted Rats through Regulating

- TXNIP/TRX/NF- κ Bp65/NLRP3 Inflammatory Pathways. Evid Based Complement Alternat Med 2020; 5809298.
<https://doi.org/10.1155/2020/5809298>
10. *Locati ET, Bagliani G, Padeletti L* (2017) Normal ventricular repolarization and QT interval: ionic background, modifiers, and measurements. *Card Electrophysiol Clin* 9(3): 487–513.
<https://doi.org/10.1016/j.ccep.2017.05.007>
 11. *Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, Arena R, Balady GJ, Bittner VA, Coke LA, Fleg JL, Forman DE, Gerber TC, Gulati M, Madan K, Rhodes J, Thompson PD, Williams MA, American Heart Association Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention Committee of the Council on Clinical Cardiology, Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, and Council on Epidemiology and Prevention* (2013) Exercise standards for testing and training: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 128(8): 873–934.
<https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31829b5b44>
 12. *Wang F, Zhao J, Wang C* (2010) The dynamic changes on ECG in different time cases after repeated exhausted exercise in rats. *Chin J Rehabil Med* 25(11): 1030–1034.
<https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1242.2010.11.003>
 13. *Аронов ДМ, Лупанов ВП* (2007) Функциональные пробы в кардиологии. М. МЕДпресс-информ. [*Aronov DM, Lupanov VP* (2007) Functional tests in cardiology. М. MEDpress-inform. (In Russ)].
 14. *Bond RR, Finlay DD, Nugent CD, Moore G, Guldenring D* (2013) Methods for presenting and visualising electrocardiographic data: From temporal signals to spatial imaging. *J Electrocardiol* 46(3): 182–196.
<https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2013.01.008>
 15. *Bergquist J, Rupp L, Zenger B, Brundage J, Busatto A, MacLeod RS* (2021) Body surface potential mapping: contemporary applications and future perspectives. *Hearts* 2(4): 514–542.
<https://doi.org/10.3390/hearts2040040>
 16. *Kania M, Maniewski R, Zaczek R, Kobylecka M, Zbiec A, Królicki L, Opolski G* (2019) High-Resolution Body Surface Potential Mapping in Exercise Assessment of Ischemic Heart Disease. *Ann Biomed Eng* 47(5): 1300–1313.
<https://doi.org/10.1007/s10439-019-02231-2>
 17. *Смирнова СЛ, Суслонова ОВ, Рощевская ИМ* (2020). Неинвазивное выявление аритмогенных очагов предсердий по кардиоэлектрическому полю на поверхности тела при экспериментальной легочной гипертензии. *Вестн аритмол* 1(99): 63–69. [*Smirnova SL, Suslonova OV, Roshehevskaya IM* (2020) Non-invasive detection of arrhythmogenic foci of atria by using the cardioelectric field on the surface of the body during experimental pulmonary hypertension. *J Arhythmol* 1(99): 63–69. (In Russ)].
<https://doi.org/10.35336/VA-2020-1-63-69>
 18. *Суслонова ОВ, Смирнова СЛ, Рощевская ИМ* (2021) Кардиоэлектрическое поле на поверхности тела крыс в период деполаризации желудочков при хроническом воздействии доксорубина. *Эксперим клин фармакол* 84(12): 9–13. [*Suslonova OV, Smirnova SL, Roshehevskaya IM* (2021) Cardioelectric field on the rat body surface during ventricular depolarization under chronic exposure to doxorubicin. *Exp Clin Pharmacol* 84(12): 9–13. (In Russ)].
<https://doi.org/10.30906/0869-2092-2021-84-12-9-13>
 19. *Walters TJ, Ryan KL, Tate LM, Mason PA* (2000) Exercise in the heat is limited by a critical internal temperature. *J Appl Physiol* 89(2): 799–806.
<https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.2.799>
 20. *Yamamoto S, Matsui K, Sasabe M, Kitano M, Ohashi N* (2000) Effect of SMP-300, a new Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, on myocardial ischemia and experimental angina models in rats. *Jpn J Pharmacol* 84(2): 196–205.
<https://doi.org/10.1254/jjp.84.196>
 21. *Poole DC, Copp SW, Colburn TD, Craig JC, Allen DL, Sturek M, O'Leary DS, Zucker IH, Musch TI* (2020) Guidelines for animal exercise and training protocols for cardiovascular studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 318(5): 1100–1138.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00697.2019>
 22. *Borges JP, Masson GS, Tibiriçá E, Lessa MA* (2014) Aerobic interval exercise training induces greater reduction in cardiac workload in the recovery period in rats. *Arq Bras Cardiol* 102(1): 47–53.
<https://doi.org/10.5935/abc.20130230>
 23. *Тарасова ОС, Борзых АА, Кузьмин ИВ, Боровик АС, Лукошкова ЕВ, Шарова АП, Виноградова ОЛ, Григорьев АИ* (2012) Динамика изменений частоты сокращений сердца у крыс при ступенчатом изменении скорости бега на тредбане. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 98(11): 1372–1379. [*Tarasova OS, Borzykh AA, Kuzmin IV, Borovik AS, Lukoshkova EV, Sharova AP, Vinogradova OL, Grigoriev AI* (2012) Dynamics of heart rate changes in rats following stepwise change of treadmill running speed. *Russ J Physiol* 98(11): 1372–1379. (In Russ)].
 24. *van de Vegte YJ, Teegene BS, Verweij N, Snieder H, van der Harst P* (2019) Genetics and the heart rate response to exercise. *Cell Mol Life Sci* 76(12): 2391–2409.
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03079-4>

25. Gleeson TT, Baldwin KM (1981) Cardiovascular response to treadmill exercise in untrained rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 50(6): 1206–1211. <https://doi.org/10.1152/jappl.1981.50.6.1206>.
26. Терегулов ЮЭ, Салымова ЛФ, Максумова НВ, Гизатуллина АФ (2018) Оценка интервала QT при проведении пробы с физической нагрузкой. *Практ мед* 1 (112): 30–36. [Teregulov YuE, Salymova LF, Maksumova NV, Gizatullina AF (2018) Evaluation of the QT interval during stress tests. *Pract Med* 1 (112): 30–36. (In Russ)].
27. Watanabe T, Harumi K, Akutsu Y, Yamanaka H, Michihata T, Okazaki O, Katagiri T (1998) Relation between exercise-induced myocardial ischemia as assessed by nitrogen-13 ammonia positron emission tomography and QT interval behavior in patients with right bundle branch block. *Am J Cardiol* 81(7): 816–821. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(98\)00002-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(98)00002-2)
28. Zonneveld MH, Noordam R, Grond JV, Sabayan B, Mooijaart SP, Mcfarlane PW, Jukema JW, Trompet S (2020) Ventricular repolarization is associated with cognitive function, but not with cognitive decline and brain magnetic resonance imaging (MRI) measurements in older adults. *J Clin Med* 9(4): 911. <https://doi.org/10.3390/jcm9040911>
29. van den Berg J, de Bie S, Meijboom FJ, Hop WC, Pattynama PM, Bogers AJ, Helbing WA (2008) Changes during exercise of ECG intervals related to increased risk for ventricular arrhythmia in repaired tetralogy of Fallot and their relationship to right ventricular size and function. *Int J Cardiol* 124(3): 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.02.009>
30. Al-Jaouni S, Abdul-Hady S, El-Bassosy H, Salah N, Hagraas M (2019) Ajwa Nanopreparation Prevents Doxorubicin-Associated Cardiac Dysfunction: Effect on Cardiac Ischemia and Antioxidant Capacity. *Integr Cancer Ther* 18: 1534735419862351. <https://doi.org/10.1177/1534735419862351>
31. Nazari A, Mohamadi A, Imani AR, Faghihi M, Tarahi MJ, Moghimian M, Cheraghi M (2021) Effect of vasopressin on electrocardiographic changes produced by ischemia-reperfusion in rats. *Pak J Pharm* 34(4): 1409–1414.
32. Tse, G, Gong M, Meng L, Wong CW, Georgopoulos S, Bazoukis G, Wong M, Letsas KP, Vassiliou VS, Xia Y, Baranchuk AM, Yan GX, Liu T (2018) Meta-analysis of $T_{peak}-T_{end}$ and $T_{peak}-T_{end}/QT$ ratio for risk stratification in congenital long QT syndrome. *J Electrocardiol* 51(3): 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2018.03.001>
33. Katheria R, Setty SK, Arun BS, Bhat P, Jagadeesh HV, Manjunath CN (2021) Significance of 'recovery ST-segment depression' in exercise stress test. *Indian Heart J* 73(6): 693–696. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2021.10.001>
34. Joukar S (2021) A comparative review on heart ion channels, action potentials and electrocardiogram in rodents and human: extrapolation of experimental insights to clinic. *Lab Anim Res* 37(1): 25. <https://doi.org/10.1186/s42826-021-00102-3>
35. Farraj AK, Hazari MS, Haykal-Coates N, Lamb C, Winsett DW, Ge Y, Ledbetter AD, Carl AP, Bruno M, Ghio A, Costa DL (2011) ST depression, arrhythmia, vagal dominance, and reduced cardiac micro-RNA in particulate-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44(2): 185–196. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0456OC>
36. Рощевская ИМ (2008) Кардиоэлектрическое поле теплокровных животных и человека. СПб. Наука. [Roshhevskaya IM (2008) Cardioelectric field of warm-blooded animals and humans. SPb. Nauka. (In Russ)].
37. Opthof T, Janse MJ, Meijborg VM, Cinca J, Rosen MR, Coronel R (2016) Dispersion in ventricular repolarization in the human, canine and porcine heart. *Prog Biophys Mol Biol* 120(1–3): 222–235. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.01.007>
38. Berntsen RF, Gjestvang FT, Rasmussen K (1995) QRS prolongation as an indicator of risk of ischemia-related ventricular tachycardia and fibrillation induced by exercise. *Am Heart J* 129(3): 542–548. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(95\)90283-x](https://doi.org/10.1016/0002-8703(95)90283-x)
39. Miller WT, Spach MS, Warren RB (1980) Total body surface potential mapping during exercise: QRS-T-wave changes in normal young adults. *Circulation* 62(3): 632–645. <https://doi.org/10.1161/01.cir.62.3.632>
40. Takala P, Hänninen H, Montone J, Mäkijärvi M, Nenonen J, Oikarinen L, Simeliu K, Toivonen L, Katil T (2001) Magnetocardiographic and electrocardiographic exercise mapping in healthy subjects. *Ann Biomed Eng* 29(6): 501–509. <https://doi.org/10.1114/1.1376388>
41. Hanninen H, Takala P, Rantonen J, Mäkijärvi M, Virtanen K, Nenonen J, Katila T, Toivonen L (2003) ST-T integral and T-wave amplitude in detection of exercise-induced myocardial ischemia evaluated with body surface potential mapping. *J Electrocardiol* 36(2): 89–98. <https://doi.org/10.1054/jelc.2003.50013>

Heart Electrical Activity during Ventricular Repolarization in Rats after Acute Exhaustive Treadmill Running

A. G. Ivonin^{a, *}, S. L. Smirnova^a, and I. M. Roshchevskaya^b

^a*Federal Research Centre Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Komi Republic, Russia*

^b*Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia*

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

The article is focused on the evaluation of the electrical activity of the heart in rats during ventricular repolarization after a single bout of forced treadmill running until exhaustion. Electrophysiological properties of the myocardium were studied by conventional ECG and body surface potential mapping. Cardiac potentials were registered in zoletil-anesthetized rats 3–5 days before (baseline) and 5, 10, 20 and 30 min after exhaustive treadmill running. Compared with baseline, an increase in the duration of the QT_{II}, JT_{II} and T_{peak}-T_{end}_{II} intervals, an earlier onset and a later completion, as well as an increase in the duration of ventricular repolarization on body surface equipotential maps (BSPMs) were revealed in rats 5 min after exhaustive exercise. Ten min following treadmill running to exhaustion, the temporal parameters of the heart electrical activity returned to pre-exercise values. Changes in the amplitude characteristics of both ECG_{II} (ST segment depression, a decrease in the T-wave amplitude) and BSPMs (a decrease in the maximum amplitudes of positive and negative extrema during ventricular repolarization) were revealed after 5–10 min and persisted up to 20–30 min after running to exhaustion. A positive correlation was found between changes in the maximum amplitude of negative extremum of BSPMs and changes in the amplitude of the T_{II}-wave in the analyzed time periods after exhausting exercise. It is assumed that the observed changes in the electrical properties of the heart in rats during ventricular repolarization after forced treadmill running were due to ischemic myocardial damage induced by exhaustive physical exercise.

Keywords: rats, treadmill, running to exhaustion, ventricular repolarization, body surface potential mapping

**ЭКСПРЕССИЯ c-Fos В КЛЕТКАХ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА КРЫС
ПОСЛЕ СУБДИАФРАГМАЛЬНОЙ ВАГОТОМИ
И ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ**

© 2022 г. А. С. Дятлова¹, О. Л. Коченда¹, *, Н. В. Лавров¹, Е. А. Корнева¹

¹*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: ol8991.kochenda@mail.ru*

Поступила в редакцию 19.06.2022 г.

После доработки 06.09.2022 г.

Принята к публикации 09.09.2022 г.

Изучение путей обмена информацией между иммунной и нервной системами остается актуальной задачей современной нейроиммунофизиологии. Участие блуждающего нерва в передаче информации о поступлении антигена в мозг обуславливает необходимость исследования паттернов активации его ядер при введении антигенов различной природы. Цель работы. Определение количества c-Fos-позитивных нейронов в ядре одиночного пути (NTS) и дорзальном моторном ядре (DMX) продолговатого мозга при интраперитонеальном введении LPS (липолисахарида) и SEB (стафилококкового энтеротоксина Б) после субдиафрагмальной ваготомии. Методы исследования. Для изучения реакций мозга на интраперитонеальное введение антигенов различной природы на фоне полной субдиафрагмальной ваготомии использовали иммуногистохимический метод исследования, выявляя маркер активации нейронов – белок c-Fos – в клетках различных зон NTS и DMX. Основные результаты. В ядре DMX не обнаружено c-Fos-позитивных клеток у контрольных животных и после введения антигенов. Введение LPS инициирует повышение количества c-Fos-позитивных клеток, наиболее выраженное в медиальной зоне NTS. После субдиафрагмальной ваготомии констатируется повышение количества c-Fos-позитивных клеток в NTS у крыс после введения LPS или SEB. Анализ зон NTS продемонстрировал, что повышение количества c-Fos-позитивных клеток после субдиафрагмальной ваготомии и последующем введении LPS происходит в латеральной, медиальной, центральной зонах NTS, а после введения SEB – только в медиальной зоне этого ядра. Выводы. Показаны особенности ответа NTS на введение определенных антигенов. После субдиафрагмальной ваготомии констатируется активация клеток NTS при введении LPS и SEB.

Ключевые слова: ваготомия, нейроиммунные взаимодействия, ядро солитарного тракта, дорзальный вагальный комплекс, c-Fos

DOI: 10.31857/S0869813922100053

Важность изучения путей и механизмов взаимодействия нервной и иммунной систем определяется тем, что патология одной из них влияет на работу и функции другой. Анализ механизмов передачи сигналов от иммунной системы к нервной и особенностей модуляции иммунного ответа нервной системой может способствовать разработке новых терапевтических подходов к лечению заболеваний аутоиммунной, аллергической, инфекционной и опухолевой природы.

Блуждающий нерв (*n. vagus*, X пара черепных нервов) обеспечивает парасимпатическую иннервацию большинства внутренних органов грудной и брюшной полостей, за исключением органов малого таза. Нерв является смешанным: 20% его волокон являются эфферентными и 80% – афферентными [1], т.е. сенсорная информация от органов грудной и брюшной полостей поступает главным образом в ядро солитарного тракта (*nucleus tractus solitarius*, NTS), хотя часть афферентных волокон проецируется в дорзальное моторное ядро блуждающего нерва (DMX), где они образуют моносинаптические связи с мотонейронами этого нерва; другие проецируются в *area postrema* (AP), – область ствола мозга, интегрирующую периферические и центральные сигналы, участвующие в формировании ощущения тошноты и индукции рвотного рефлекса. Часть нейронов NTS второго порядка проецируется в DMX, а часть – на вышележащие структуры мозга, включая гипоталамус и лимбическую систему, модулирующие вегетативные функции и поведение [2].

На периферии сенсорные нейроны блуждающего нерва экспрессируют широкий спектр рецепторов, включая рецепторы нейромодуляторов, цитокинов и факторов роста [3]. Кроме того, существуют хемосенсорные параганглии, связанные с брюшными ветвями блуждающего нерва. Параганглии находятся за пределами желудочно-кишечного тракта. Высказано предположение, что параганглии блуждающего нерва могут служить второй линией хеморецептивной защиты, мониторируя сгустки крови и лимфы в сосудах желудочно-кишечного тракта и модулируя интенсивность афферентации [4].

Блуждающий нерв рассматривается в качестве ключевого посредника передачи информации от иммунной системы к нервной. В работах группы Трасеу описан так называемый “рефлекс воспаления” – противовоспалительный ваговагальный рефлекс, реализующийся в результате передачи информации по афферентным волокнам блуждающего нерва в парасимпатические центры продолговатого мозга. Клетки иммунной системы при обнаружении антигена активируются и выделяют провоспалительные цитокины (IL-1, 6, TNF- α), которые воспринимают афферентные волокна блуждающего нерва. Информация о развитии воспалительного процесса по афферентным волокнам блуждающего нерва поступает в продолговатый мозг (NTS, DMX), где происходит активация эфферентных путей блуждающего нерва с последующей секрецией ацетилхолина в их дистальных отделах, что приводит к противовоспалительному эффекту [5, 6]. Таким образом, предполагается, что блуждающий нерв участвует в регуляции процессов воспаления.

Среди иммуногенов выделяют две группы антигенов – Т-зависимые и Т-независимые. К первым относятся в основном полисахариды и липополисахариды (LPS, туберкулин, полисахариды капсулы пневмококка, фиколл). Тимусзависимые антигены представляют собой белки или гаптены, ассоциированные с белками. К таким антигенам относятся сывороточные белки (бычий сывороточный альбумин), бактериальные токсины (стафилококковый энтеротоксин), вирусы, а также антигены чужеродных эритроцитов [7]. Механизм иммунного ответа на тимусзависимые и тимуснезависимые антигены различен. Особенности механизмов нервной регуляции ответной реакции организма на введение антигенов различной природы изучаются.

Предприняты попытки выяснить пути, по которым информация о пероральном и интраперитонеальном введении липополисахарида (LPS) и стафилококкового энтеротоксина Б (SEB) в организм достигает нейронов головного мозга, для чего оценивали сосудистые реакции мозга [8], а также количество с-Fos-позитивных нейронов в ядрах блуждающего нерва в ответ на введение SEB до и после полной и селективной ваготомии [9]. Результаты этих и других подобных исследований противоречивы.

Целью настоящей работы явилось определение количества c-Fos-позитивных нейронов в ядре одиночного пути (NTS) и дорзальном моторном ядре (DMX) при интраперитонеальном введении LPS и SEB после субдиафрагмальной ваготомии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на 45 самцах крыс линии Вистар массой 200–250 г. План исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ Институт экспериментальной медицины (протокол № 6/20 от 21.10.20).

Для выявления реакций клеток ядер блуждающего нерва на введение антигенов различной природы 15 экспериментальным животным интраперитонеально вводили физиологический раствор ($n = 5$), LPS (500 мкг/кг, $n = 5$) или SEB (500 мкг/кг, $n = 5$) в объеме 250 мкл. Через 2 ч после инъекции животных наркотизировали и выводили из эксперимента путем транскардиальной перфузии физиологическим раствором с последующей фиксацией 4%-ным раствором параформальдегида. Доза и время воздействия антигена были подобраны в соответствии с литературными данными и первичной апробацией методики [9, 10].

Субдиафрагмальная ваготомия. Для изучения влияния субдиафрагмальной ваготомии на активность нейронов NTS при введении LPS и SEB 15 экспериментальных животных были подвергнуты субдиафрагмальной ваготомии и 15 – аналогичным хирургическим манипуляциям, но без пересечения блуждающего нерва.

Все оперативные вмешательства производили при использовании золетил-ксилаинового наркоза по следующей схеме: Золетил 0.3 мг в/м (Virbac, Франция), Ксила 0.8 мг в/м (Интерхеми Верхен, Нидерланды) из расчета на 100 г массы тела животного. Наркоз верифицировали по исчезновению реакции на болевые раздражители (укол лапы) и угнетению роговичного рефлекса. Для проведения процедуры субдиафрагмальной двусторонней ваготомии животное располагали на спине и фиксировали на подложке. Шерсть в районе живота аккуратно выстригали ножницами. Стерильным скальпелем производили небольшой вертикальный разрез в области желудка ниже диафрагмы, не повреждая ее. Далее извлекали желудок с частью пищевода, препарировали правую ветвь блуждающего нерва, идущую вдоль пищевода совместно с крупными сосудами. На правую ветвь блуждающего нерва и сосуды накладывали плотную лигатуру. Затем препарировали левую ветвь блуждающего нерва и перерезали ее. Желудок аккуратно помещали назад в брюшную полость. Разрез ушивали послойно: сначала зашивали мышечный слой, затем кожу. Поверхность шва обрабатывали антисептиком. После операции однократно внутримышечно вводили 0.2 мл Цефтриаксона (Рафарма АО, Россия).

Через 2–3 дня восстановительного периода животным вводили антигены либо физиологический раствор, и через 2 ч их выводили из эксперимента путем транскардиальной перфузии. Таким образом, во второй части эксперимента исследовали 6 экспериментальных групп (табл. 1).

После транскардиальной перфузии головной мозг извлекали, дополнительно фиксировали, оставляя в 4%-ном растворе параформальдегида при 4°C на двое су-

Таблица 1. Экспериментальные группы исследования

Группы животных	
V + физ. раствор	F-O + физ. раствор
V + LPS (500 мкг/кг)	F-O + LPS (500 мкг/кг)
V + SEB (500 мкг/кг)	F-O + SEB (500 мкг/кг)

V – ваготомированные, F-O – ложноперированные животные.

ток. После фиксации осуществляли проводку образца по растворам сахарозы восходящей концентрации (10, 15 и 20%), выдерживая по 1 ч в каждом растворе при комнатной температуре. Затем образец, погруженный в 20%-ный раствор сахарозы, оставляли при 4°C на ночь. На следующий день изготавливали замороженные срезы продолговатого мозга (уровни 65–73 в соответствии с атласом мозга крысы Swanson), используя микротом Reichert Austria и замораживающий столик Миконта-02. Срезы помещали в 30%-ный раствор сахарозы и замораживали при –21°C до последующего иммуногистохимического исследования.

Иммуногистохимический анализ c-Fos-позитивных нейронов. Срезы продолговатого мозга отмывали 3 раза по 5 мин в PBS, затем осуществляли демаскировку антигена в цитратном буфере (pH 6.0) и блокировку неспецифичного окрашивания, инкубируя срезы в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) с добавлением 0.04% Triton-X100. В качестве первичных антител использовали поликлональные антитела кролика к c-Fos (Anti-c-Fos antibody – BSA free (ab190289), Abcam) в разведении 1 : 1000. Инкубацию срезов с первичными антителами проводили в течение двух суток при 4°C. Затем срезы промывали PBS 3 раза по 5 мин, после чего проводили инкубацию со вторичным антителами, меченными биотином (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Biotin) (ab97049)) в разведении 1 : 1000 в течение 1 ч при комнатной температуре. После трехкратной смены PBS срезы инкубировали в растворе авидин-пероксидазы (Sigma) в разведении 1 : 2500 в течение 1 ч при комнатной температуре. Срезы трижды промывали PBS, затем осуществляли визуализацию антигена, используя DAB substrate kit (Abcam).

Окрашенные срезы промывали dH₂O, монтировали на стекла, высушивали в течение суток и заключали, используя канадский бальзам (Sigma).

Основываясь на предыдущих исследованиях, анализировали каудальную часть дорзального вагального комплекса (уровень 67 в соответствии с атласом мозга крысы Swanson). Также анализу подвергали дорзальное моторное ядро блуждающего нерва и ядро одиночного пути. Подсчет c-Fos-позитивных клеток в ядре NTS осуществляли в трех зонах: медиальной (NTSm), центральной (NTSce) и латеральной (NTSl), используя программное обеспечение ImageJ (НИН, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили, используя методы непараметрической статистики, в программном обеспечении R Studio. Для обработки результатов первой части эксперимента использовали непараметрический аналог дисперсионного анализа – критерий Краскелла–Уоллиса, с последующим применением post-hoc критерия Данна. Для обработки результатов второй части эксперимента использовали U-критерий Манна–Уитни для попарного сравнения групп по схеме “опыт–контроль”.

Для визуализации полученных результатов использовали библиотеки Seaborn и Matplotlib в Jupiter Notebook.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой части исследования изучали реакцию клеток ядер блуждающего нерва на введение антигенов – LPS и SEB.

Подсчет осуществляли билатерально в ядрах NTS и DMX. В DMX c-Fos-позитивные нейроны после введения антигенов не обнаружены.

В ядре NTS на 67-ом уровне выделяют три зоны: медиальную (NTSm), латеральную (NTSl) и центральную (NTSce) (рис. 1).

Установлено, что после введения LPS происходит увеличение количества c-Fos-позитивных нейронов в ядре NTS, чего не наблюдается после введения SEB (рис. 1, 2).

После введения LPS увеличение количества c-Fos-позитивных нейронов в NTS происходит за счет возрастания их числа в медиальной зоне ядра в 4.5 раза по срав-

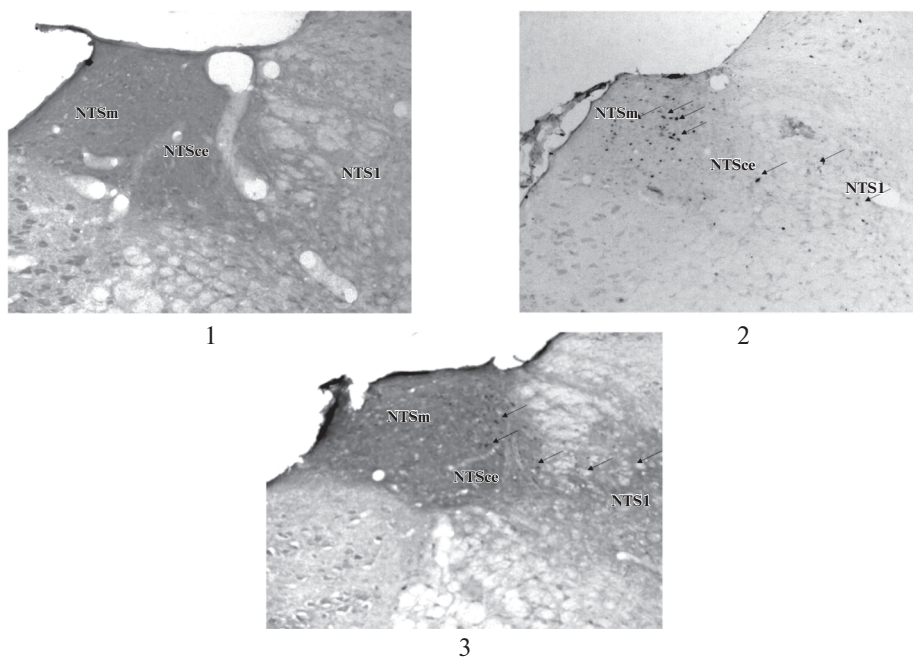


Рис. 1. Реакция клеток NTS на введение антигенов различной природы. Срезы мозга крыс: 1 – контроль, 2 – после введения липополисахарида в дозе 500 мкг/кг, 3 – после введения стафилококкового энтеротоксина Б в дозе 500 мкг/кг. Иммуногистохимическое окрашивание, c-Fos, $\times 10$.

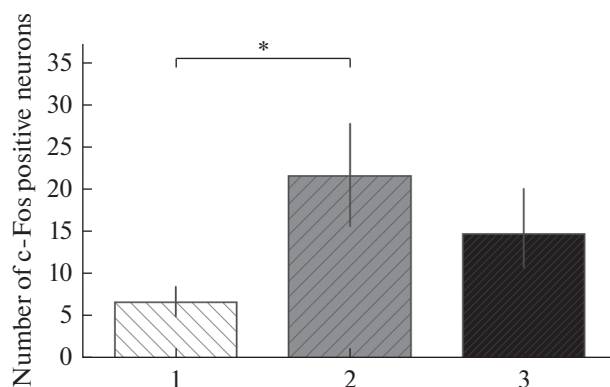


Рис. 2. Количество c-Fos-положительных нейронов в NTS после введения антигенов различной природы. 1 – контроль, 2 – введение липополисахарида в дозе 500 мкг/кг, 3 – введение стафилококкового энтеротоксина Б в дозе 500 мкг/кг. * – $p < 0.05$.

нению с контролем ($p < 0.001$, рис. 3). При этом в остальных зонах отличия от контроля не достоверны.

Таким образом, установлено, что NTS, входящее в дорзальный вагальный комплекс, реагирует на введение Т-независимого антигена LPS увеличением количе-

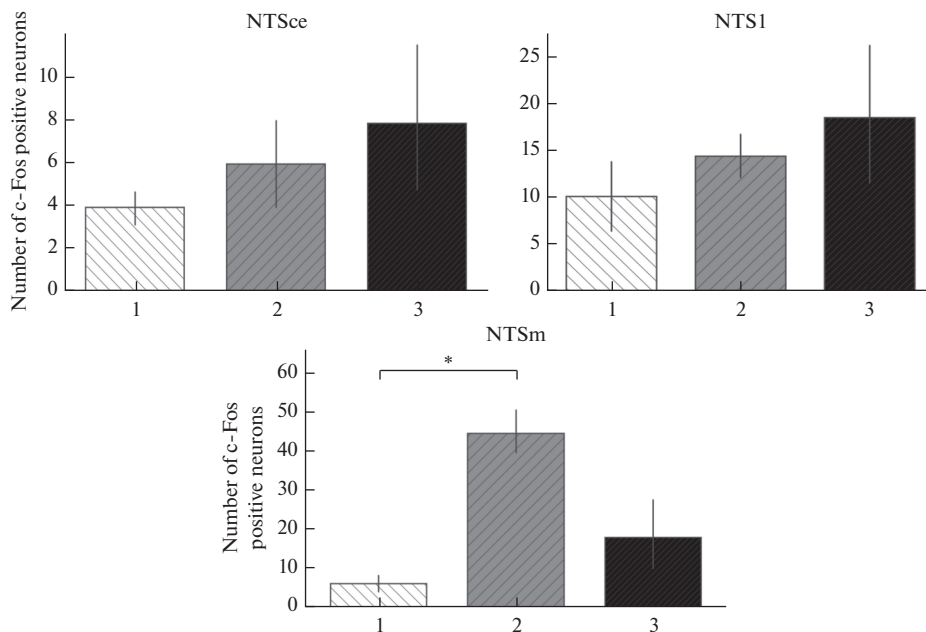


Рис. 3. Количество c-Fos-положительных нейронов в разных зонах NTS продолговатого мозга после введения антигенов различной природы.

1 – контроль, 2 – введение липополисахарида в дозе 500 мкг/кг, 3 – введение стафилококкового энтеротоксина Б в дозе 500 мкг/кг.

NTSm – медиальная, NTSI – латеральная, NTSce – центральная зона. * – $p < 0.001$.

ства активированных нейронов, расположенных в медиальной части ядра, чего не происходит при введении T-зависимого антигена – SEB.

В клетках DMX c-Fos-положительные нейроны после введения антигенов не обнаружены как после субдиафрагмальной ваготомии, так и у ложнооперированных крыс.

После субдиафрагмальной ваготомии констатируется возрастание интенсивности активации нейронов NTS после введения LPS и SEB (рис. 4).

После введения физиологического раствора не наблюдалось различий между животными исследуемых групп. При введении LPS после субдиафрагмальной ваготомии в зонах NTS происходило повышение количества c-Fos-положительных нейронов, а введение SEB инициировало увеличение количества этих нейронов после субдиафрагмальной ваготомии в нейронах медиальной зоны NTS (рис. 5, 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Перекрест и соавт. [10] продемонстрировали, что при введении антигенов различной природы – LPS и BSA – происходит активация гипоталамических структур, оцениваемая по интенсивности экспрессии *c-fos*-гена и количеству c-Fos-положительных клеток. Было показано, что паттерны активации этих клеток после введения различных антигенов не одинаковы: реакция на LPS характеризовалась активацией большего количества нейронов, это было наиболее выражено в передней гипоталамической области, паравентрикулярном ядре, латеральном и заднем гипоталамусе. Введение BSA приводило к активации меньшего количества нейро-

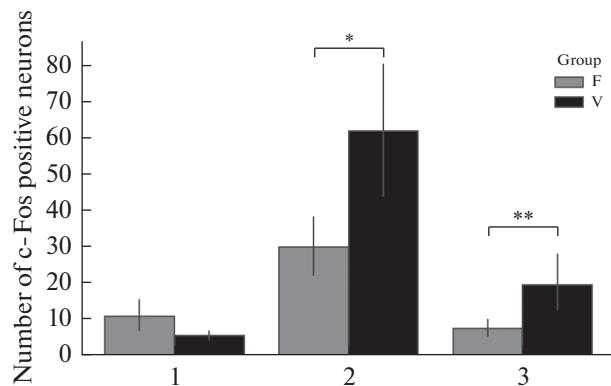


Рис. 4. Количество c-Fos-положительных нейронов в ядре NTS продолговатого мозга при введении антигенов различной природы после субдиафрагмальной ваготомии. 1 – контроль, 2 – введение липополисахарида в дозе 500 мкг/кг, 3 – введение стафилококкового энтеротоксина Б в дозе 500 мкг/кг, F – ложнооперированные, V – ваготомированные животные. * – $p < 0.05$ по сравнению с ложнооперированными животными и введением LPS, ** – $p < 0.05$ по сравнению с ложнооперированными животными и введением SEB.

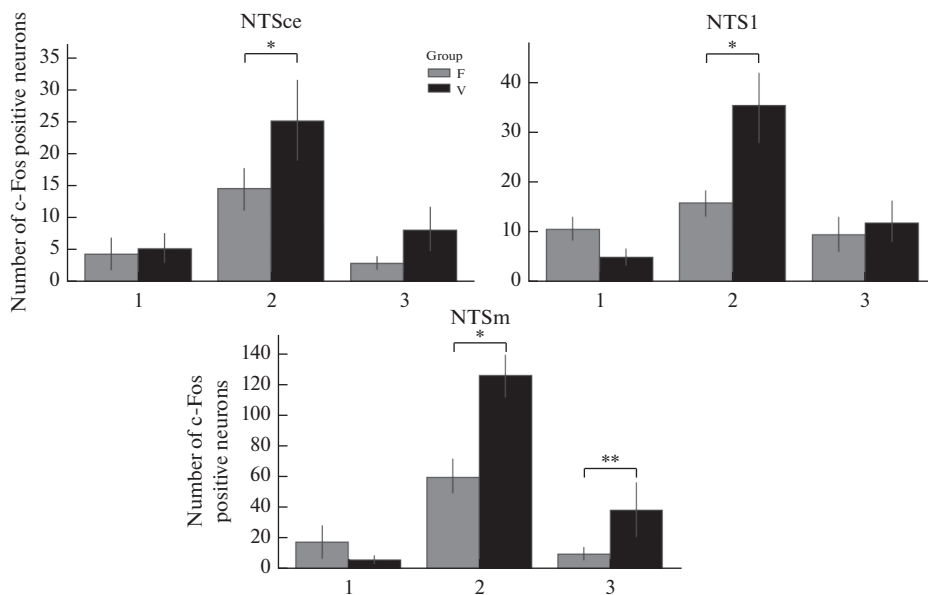


Рис. 5. Количество c-Fos-положительных нейронов в зонах NTS после введения антигенов различной природы на фоне субдиафрагмальной ваготомии. 1 – контроль, 2 – введение LPS в дозе 500 мкг/кг, 3 – введение SEB в дозе 500 мкг/кг, F – ложнооперированные, V – ваготомированные животные. NTSm – медиальная, NTS1 – латеральная, NTSce – центральная зона. * – $p < 0.05$ по сравнению с группой ложнооперированных животных и введением LPS, ** – $p < 0.05$ по сравнению с группой ложнооперированных животных и введением SEB.

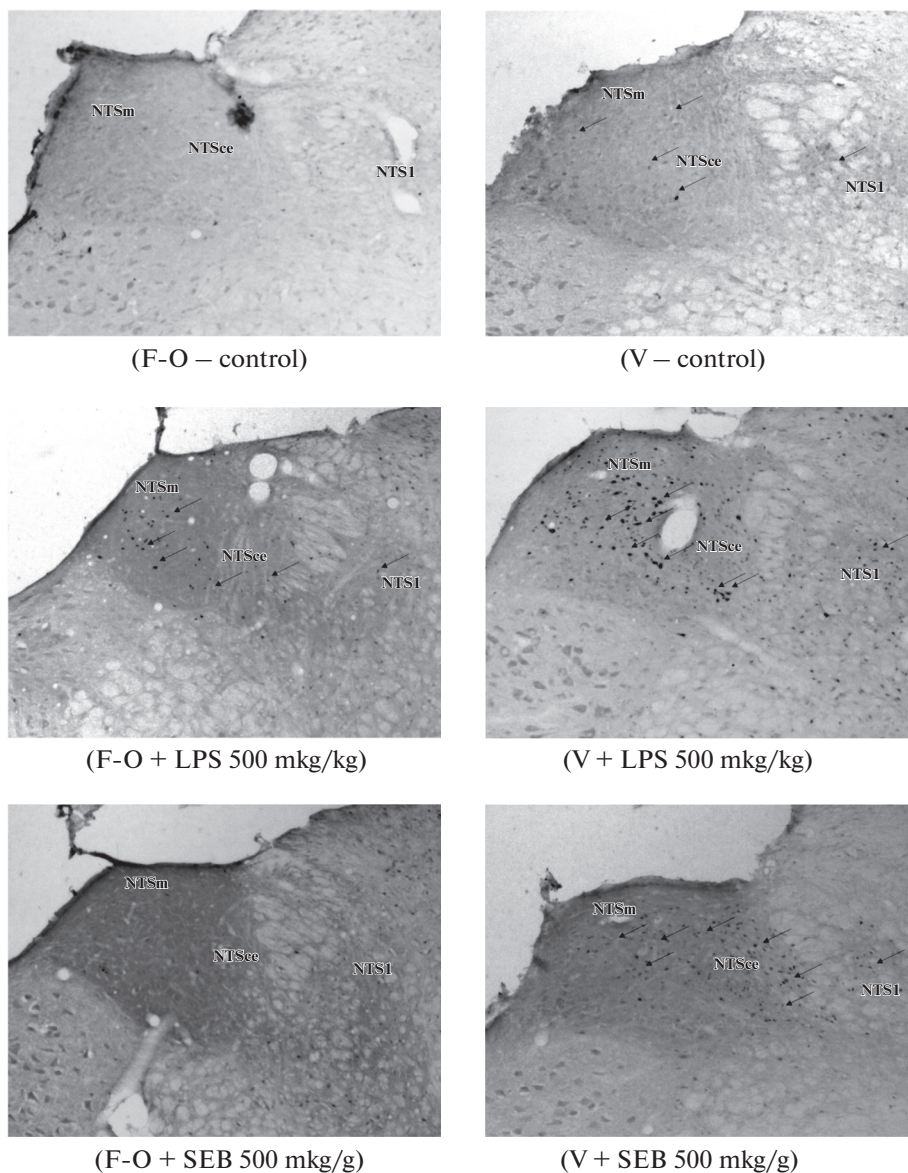


Рис. 6. Срезы продолговатого мозга крысы в области NTS при введении антигенов различной природы после субдиафрагмальной ваготомии. Иммуногистохимическое окрашивание, c-Fos, $\times 10$. F-O – ложнооперированные животные, V – животные после субдиафрагмальной ваготомии.

нов, но с большим количеством c-Fos-белка в них, что выразилось в повышении оптической плотности нейронов в структурах вентромедиального, латерального и заднего гипоталамуса [10].

Блуждающий нерв и его ядра также относят к компонентам центральной автономной сети [11, 12]. Трацеву и соавт. ввели понятие холинергического противовос-

палительного рефлекса, реализуемого посредством блуждающего нерва. Активность афферентных волокон вагуса стимулируется цитокинами и PAMP, после чего сигнал через NTS и DMX активирует эфферентные волокна вагуса. Эфферентный (холинергический) блуждающий нерв стимулирует CD4⁺ Т-клетки в селезенке через селезеночный симпатический (адренергический) нерв. Высвобожденный норадреналин в селезенке связывается с β 2-адренорецепторами (β 2AR) на CD4⁺ Т-клетках, что ведет к высвобождению ими ацетилхолина, который в свою очередь связывается с альфа-7-никотин-ацетилхолиновыми рецепторами (α 7nAChR) на макрофагах и вызывает противовоспалительный ответ, такой как подавление TNF- α [13].

Показана активация дорзального вагального комплекса, оцениваемая по количеству c-Fos-позитивных нейронов, при введении различных антигенов – LPS, SEB и провоспалительных цитокинов (IL-1, TNFa) [14]. Настоящее исследование частично подтверждает эти данные: согласно полученным результатам, ядро одиночного пути, входящее в состав дорзального вагального комплекса, активируется при введении LPS, но не при введении SEB. Возможно, это связано с недостаточным временем воздействия и дозой SEB: некоторые авторы описывали реакции NTS на SEB в дозе 1 мг/кг через 4 ч после интраперитонеального введения [15].

Продемонстрированные нами различия ответа клеток различных зон NTS на введение LPS ранее не описаны в литературе, за исключением одного сообщения [16]. Согласно полученным данным, медиальная часть каудального NTS обеспечивает активацию дорзального вагального комплекса при введении LPS. Известно, что каудальная часть NTS получает висцеросенсорную информацию, а также через медиальный пучок переднего мозга (MFB) или дорсальный продольный пучок (DLF) посылает проекции в широкий спектр областей мозга: вентролатеральный продолговатый мозг (VLM), гипоталамус, центральное ядро миндалевидного тела (ACe), ядро ложа терминальной полоски (BNST), задние рога спинного мозга, ретикулярную формацию ствола мозга, голубое пятно (LC), серый периакведукт (PAG) [17]. Медиальная зона NTS обеспечивает общую висцеральную иннервацию, а вентролатеральная часть ядра регулирует респираторную функцию и обеспечивает регуляцию вкусовой сенсорной системы [18].

Полученные данные демонстрируют, что NTS реагирует на введение LPS, но не на введение SEB.

Изучение участия блуждающего нерва в передаче информации о поступлении антигена в ЦНС позволило показать, что перерезка блуждающего нерва приводит к снижению активации его ядер в продолговатом мозге в ответ на введение Т-зависимых и Т-независимых антигенов [8, 9, 19, 20], что подтверждает гипотезу о передаче по волокнам вагуса информации о поступлении антигена. Однако результаты некоторых работ демонстрируют, что таких изменений не происходит [21, 22].

Показан совершенно другой паттерн активации ядра одиночного пути блуждающего нерва после субдиафрагмальной ваготомии и введении антигена. Перерезка блуждающего нерва не только не была связана со снижением активации NTS в ответ на введение LPS и SEB по сравнению с ложнооперированными животными, но и ассоциировалась с увеличением количества c-Fos-позитивных нейронов при введении как LPS, так и SEB.

Реакция различных зон NTS на введение антигенов после субдиафрагмальной ваготомии отличаются: введение LPS приводит к повышению количества c-Fos-позитивных нейронов во всех зонах ядра. В то же время при введении SEB активируется только медиальная зона ядра, но не латеральная и центральная, демонстрируя различия паттерна активации NTS на введение антигенов после субдиафрагмальной ваготомии.

В работе Somann и соавт. [23] получены результаты, позволяющие предположить, что различные ветви блуждающего нерва по-разному влияют на интенсив-

ность продукции цитокинов (IL-10, TNF- α , GM-CSF, IL-17F, IL-6, IL-22, INF- γ) при введении антигена. Крысам вводили LPS и анализировали соответствующие эффекты электрической стимуляции поддиафрагмальных ветвей (передняя желудочная, добавочная чревная и печеночная) левого блуждающего нерва в течение 5.5 ч после введения антигена. Авторы настаивают на том, что внутрибрюшинное введение LPS приводит к физиологически значимой стимуляции воспаления и вызывает системную реакцию. При внутривенном введении LPS сразу поступает в кровоток. Высказано предположение, что это объясняет более высокую вариабельность результатов исследований, выполненных на модели внутрибрюшинного введения LPS крысам [23].

Согласно данным Hofmann и соавт. [24, 25], односторонняя ваготомия вызывает изменения морфологии астроцитов и микроглии в области NTS и DMX в сторону реактивного фенотипа, что может свидетельствовать о возникновении нейровоспаления. В таком случае любой из вводимых антигенов может усилить уже возникшее нейровоспаление, что объясняет реакцию NTS на SEB при ваготомии, которая не наблюдалась в отсутствие хирургических манипуляций.

Полученные результаты демонстрируют, что эффекты пересечения блуждающего нерва на активацию NTS не однозначны, как было описано ранее, это может быть связано, в том числе, с избирательным участием различных ветвей *n. vagus* в регуляции продукции цитокинов на введение антигена, а также с усилением антигенами возникающего при ваготомии нейровоспаления.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента: Е.А.К., А.С.Д.; сбор данных: А.С.Д., О.Л.К., Н.В.Л.; обработка данных: А.С.Д.; написание и редактирование манускрипта А.С.Д., О.Л.К., Н.В.Л., Е.А.К.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-01413-20-03 на 2020 г. и на плановый период 2021 и 2022 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prechtl JC, Powley TL (1990) The fiber composition of the abdominal vagus of the rat. *Anat Embryol* 181: 101–115.
<https://doi.org/10.1007/BF00198950>
2. Gasparini S, Howland JM, Thatcher AJ, Geerling JC (2020) Central afferents to the nucleus of the solitary tract in rats and mice. *J Compar Neurol* 528: 2708–2728.
<https://doi.org/10.1002/cne.24927>
3. Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S (2016) Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation. *J Physiol* 594: 5781–5790.
<https://doi.org/10.1113/JP271539>
4. Hillsley K, Grundy D (2004) Vagus Nerve. In: Johnson LR (ed) *Encyclopedia of Gastroenterology*. Elsevier. New York. 573–576.
5. Czura CJ, Tracey KJ (2005) Autonomic neural regulation of immunity. *J Intern Med* 257: 156–166.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01442.x>
6. Pavlov VA, Tracey KJ (2017) Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nat Neurosci* 20: 156–166.
<https://doi.org/10.1038/nn.4477>

7. Calzetta L, Luongo L, Cazzola M, Page C, Rogliani P, Facciolo F, Maione S, Capuano A, Rinaldi B, Matera MG (2015) Contribution of sensory nerves to LPS-induced hyperresponsiveness of human isolated bronchi. *Life Sci* 131: 44–50.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.03.023>
8. Serrats J, Sawchenko PE (2009) How T-Cell-Dependent and -Independent Challenges Access the Brain: Vascular and Neural Responses to Bacterial Lipopolysaccharide and Staphylococcal Enterotoxin B. *Brain Behav Immunol* 23: 1038–1052.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.06.004>
9. Wang X, Wang B-R, Zhang X-J, Duan X-L, Guo X, Ju G (2004) Fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of Staphylococcus enterotoxin B and the effect of vagotomy. *Neurochem Res* 29: 1667–1674.
<https://doi.org/10.1023/b:nere.0000035801.81825.2a>
10. Перекрест СВ, Гаврилов ЮВ, Абрамова ТВ, Новикова НС, Корнева ЕА (2006) Активация клеток гипоталамических структур при введении антигенов различной природы (по экспрессии c-Fos гена). *Мед иммунол* 8: 631–636. [Perekrest SV, Gavrilov YuV, Abramova TV, Novikova NS, Korneva EA (2006) Activation of cells of hypothalamic structures with the introduction of antigens of various nature (by expression of the c-Fos gene). *Med immunol* 8: 631–636. (In Russ)].
11. Sklerov M, Dayan E, Browner N (2019) Functional neuroimaging of the central autonomic network: recent developments and clinical implications. *Clin Auton Res* 29: 555–566.
<https://doi.org/10.1007/s10286-018-0577-0>
12. Reisert M, Weiller C, Hosp JA (2021) Displaying the autonomic processing network in humans – a global tractography approach. *Neuroimage* 231: 117852.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.117852>
13. Tracey KJ (2007) Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 117: 289–296.
<https://doi.org/10.1172/JCI30555>
14. Goehler LE, Erisir A, Gaykema RPA (2006) Neural-immune interface in the rat area postrema. *Neuroscience* 140: 1415–1434.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.03.048>
15. Goehler LE, Gaykema RP, Hansen MK, Kleiner JL, Maier SF, Watkins LR (2001) Staphylococcal enterotoxin B induces fever, brain c-Fos expression, and serum corticosterone in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1434–R1439.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.5.R1434>
16. Friedrich T, Schalla M, Goebel-Stengel M, Kobelt P, Rose M, Stengel A (2022) Inflammatory Stress Induced by Intraperitoneal Injection of LPS Increases Phoenixin Expression and Activity in Distinct Rat Brain Nuclei. *Brain Sci* 12: 135.
<https://doi.org/10.3390/brainsci12020135>
17. Kawai Y (2018) Differential Ascending Projections From the Male Rat Caudal Nucleus of the Tractus Solitarius: An Interface Between Local Microcircuits and Global Macrocircuits. *Front Neuroanat* 12.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00063>
18. Herbert H, Moga MM, Saper CB (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 293: 540–580.
<https://doi.org/10.1002/cne.902930404>
19. Tillingier A, Mravec B (2021) Vagotomy Affects Lipopolysaccharide-Induced Changes of Urocortin 2 Gene Expression in the Brain and on the Periphery. *Neurochem Res* 46: 159–164.
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03165-1>
20. Azab AN, Kaplanski J (2001) Vagotomy attenuates the effect of lipopolysaccharide on body temperature of rats in a dose-dependent manner. *J Endotoxin Res* 7: 359–364.
21. Hermann GE, Emch GS, Tovar CA, Rogers RC (2001) c-Fos generation in the dorsal vagal complex after systemic endotoxin is not dependent on the vagus nerve. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R289–299.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.1.R289>
22. Hansen MK, Nguyen KT, Fleshner M, Goehler LE, Gaykema RP, Maier SF, Watkins LR (2000) Effects of vagotomy on serum endotoxin, cytokines, and corticosterone after intraperitoneal lipopolysaccharide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R331–R336.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.278.2.R331>
23. Somann JP, Wasilczuk KM, Neihouser KV, Sturgis J, Albors GO, Robinson JP, Powley TL, Irazoqui PP (2019) Characterization of plasma cytokine response to intraperitoneally administered LPS & subdiaphragmatic branch vagus nerve stimulation in rat model. *PLoS One* 14: e0214317.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214317>
24. Hofmann GC, Hasser EM, Kline DD (2021) Unilateral vagotomy alters astrocyte and microglial morphology in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*

- 320: R945–R959.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00019.2021>
25. Gallaher ZR, Ryu V, Herzog T, Ritter RC, Czaja K (2012) Changes in microglial activation within the hindbrain, nodose ganglia, and the spinal cord following subdiaphragmatic vagotomy. *Neurosci Lett* 513: 31–36.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.01.079>

c-Fos Expression in Rat Medulla Oblongata after Subdiaphragmatic Vagotomy and Various Antigens Administration

A. S. Diatlova^a, O. L. Kochenda^{a, *}, N. V. Lavrov^a, and E. A. Korneva^a

^a*Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia*

**E-mail: ol8991.kochenda@mail.ru*

Neuroimmune interactions pathways are the current interests of neuroimmunophysiology. As it shown, n. vagus is a part of neuroimmune communications, so determination of activation patterns of n. vagus is the relevant task. The aim of the study is to determine the amount of c-Fos-positive neurons in nuclei tractus solitarius (NTS) and dorsal motor nuclei (DMX) in rat medulla oblongata after subdiaphragmatic vagotomy and various antigens administration. Immunohistochemistry and morphometry were performed for determination of c-Fos-positive neurons amount in different zones of NTS and DMN. In the cells of DMX were not observed any c-Fos-positive neurons in control and after subdiaphragmatic vagotomy. LPS administration (500 mkg/kg) induced the increasing of c-Fos-positive neurons amount in NTS, particularly in medial NTS. Subdiaphragmatic vagotomy leads to increasing of c-Fos-positive neurons amount in NTS after LPS or SEB (500 mkg/kg) administration. LPS injection after subdiaphragmatic vagotomy induced an activation of neurons of the lateral, medial and central NTS, while SEB administration induced only medial NTS activation. Therefore, the pattern of NTS response to the introduction of certain antigens are shown. Subdiaphragmatic vagotomy leads to activation of NTS after the introduction of LPS and SEB.

Keywords: vagotomy, neuroimmune interactions, NTS, DMX, c-Fos

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ В ВОДНОМ
ЛАБИРИНТЕ МОРРИСА КРЫС ЛИНИИ W1STAR, ДЛИТЕЛЬНО
ПОТРЕБЛЯЮЩИХ ЭТАНОЛ, И КРЫС-ГЕТЕРОЗИГОТ ПО НОКАУТУ
ГЕНА ДОФАМИНОВОГО ТРАНСПОРТЕРА DAT**

© 2022 г. Е. В. Филатова^{1, *}, Г. Е. Громова¹, М. В. Дорофейкова¹,
И. В. Антонова¹, А. Ю. Егоров¹

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

**E-mail: filena17@gmail.com*

Поступила в редакцию 30.06.2022 г.

После доработки 26.08.2022 г.

Принята к публикации 13.09.2022 г.

Нарушения в работе дофаминергической (ДА) системы лежат в основе большого числа патологий. Перспективной моделью для исследований является модель умеренного повышения активности ДА системы: крысы DAT-НЕТ, гетерозиготные по нокауту гену дофаминавого транспортера. Они отличаются большей подвижностью и когнитивными нарушениями, которые позволяют рассматривать их как возможную модель таких патологий, как синдром дефицита внимания и гиперактивности. Известно, что хроническое потребление этанола приводит к истощению дофамина, в частности в стриатуме. Мы предположили, что хронически потребляющие этанол крысы могут служить моделью умеренной гиподофаминергии, в противовес крысам гетерозиготам по нокауту гена дофаминавого транспортера. Целью работы было исследование влияния такой модуляции ДА системы на обучение и выполнение задачи пространственной навигации в водном лабиринте Морриса. Обнаружено снижение уровня дофамина по сравнению с гетерозиготами только у крыс с более высоким уровнем предпочтения этанола. Крысы DAT-НЕТ в условиях лабиринта Морриса значительно больше, чем крысы других групп проявляли непродуктивную стратегию тигмотаксиса, что приводило к более позднему обучению. Возможно, наблюдаемые нарушения в обучении пространственной задачи связано с их повышенной реакцией на стресс, проявляемой, в частности, высоким уровнем дефекации в бассейне. Крысы с хроническим воздействием этанола демонстрируют более поздний, по сравнению с контролем, целенаправленный поиск платформы, что выражается в меньшем времени, проведенном в целевом секторе в начале обучения каждой новой задаче. Исследование позволяет сделать вывод, что разнонаправленная умеренная модуляция активности ДА системы, вызванная различными факторами, не приводит к фатальным нарушениям выполнения задач пространственной навигации в водном лабиринте Морриса, однако снижает когнитивную гибкость, выражаемую в более длительном периоде использования непродуктивных стратегий.

Ключевые слова: крысы гетерозиготы по нокауту гена транспортера дофамина, лабиринт Морриса, хроническое потребление этанола

Известно, что дофаминергическая (ДА) система играет важную роль в обучении и реализации поведения, в том числе, связанным с пространственной навигацией [1]. Перспективной моделью изучения нарушений работы ДА системы являются животные с нокаутом гена транспортера дофамина [2]. У гетерозиготных особей наблюдается уменьшение экспрессии функционального белка-переносчика дофамина примерно на 50% по сравнению с обычными животными. Крысы гомозиготы и гетерозиготы показывают повышенный уровень базального внеклеточного ДА в стриатуме, с 8- и 3-кратным увеличением над крысами дикого типа. При этом, в отличие от гомозиготных особей, у гетерозигот не наблюдается снижения уровня внутриклеточного дофамина [3]. Крысы гетерозиготы представляют собой модель умеренного повышения активности ДА системы и отличаются повышенной подвижностью и снижением ряда когнитивных функций [4].

Одной из важных структур, участвующих в обработке пространственной информации, является стриатум [5]. В фармакологических экспериментах показано, что неостриатальный дофамин модулирует как эгоцентрическую, так и аллоцентрическую навигацию [6]. Предполагается, что стриатум участвует в интеграции как пространственной информации, так и информации, связанной с вознаграждением, которая, в свою очередь, влияет на произвольные двигательные выходные структуры для достижения точного навигационного поведения [7].

Многочисленные исследования посвящены роли катехоламинов в формировании алкогольной зависимости [8]. Известно, что острое воздействие этанола приводит к повышенному выбросу дофамина в стриатуме [9, 10]. Показано, что острое воздействие влияет только на выброс дофамина, но не на его клиренс [11]. Причем, различия в эффектах острого этанола на высвобождение ДА в стриатуме не обнаружено между мышами дикого типа и мышами с нокаутом гена переносчика ДА, что позволило предположить об отсутствии прямого воздействия этанола на DAT [12]. При хроническом же потреблении в ответ на повышение уровня внеклеточного дофамина возрастает его обратный захват [13]. Также показано, что хроническое потребление алкоголя приводит к истощению тканевого уровня дофамина [14].

Мы предположили, что хронически потребляющие этанол крысы могут служить моделью умеренной гиподофаминергии, в противовес крысам гетерозиготам по нокауту гена дофаминового транспортера. Целью работы было исследование влияния такой модуляции дофаминергической системы на обучение и выполнение задачи пространственной навигации в водном лабиринте Морриса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные

Исследование проводилось на 34 половозрелых крысах самцах в 3 экспериментальных группах. 1-я группа – крысы гетерозиготы DAT-НЕТ ($n = 14$), предоставленные Институтом трансляционной биомедицины Санкт-Петербургского государственного университета. DAT-НЕТ крысы получены путем скрещивания крыс гомозигот по дофаминовому транспортеру (DAT-KO) с аутбредными животными. В свою очередь, крысы DAT-KO созданы в SAGE Labs на основе аутбредных крыс линии Вистар Хан с использованием методики “цинковых пальцев” редактирования генома. Модификация гена *Slc6a3* приводит к отсутствию функционального DAT у этих крыс [3]. 2-я группа – крысы линии Wistar, подвергнутые длительной хронической алкоголизации ($n = 10$) и 3-я группа – крысы линии Wistar, контрольные животные, не получавшие алкоголь ($n = 10$). На начало эксперимента крысы были в возрасте 3 мес. с массой тела 352.1 ± 5.8 г – 1-я группа; 251 ± 5.9 г – 2-я группа и 279.2 ± 7.3 г – 3-я группа. В конце эксперимента масса тела крыс DAT-НЕТ состав-

ляля 415 ± 7.1 г, масса животных, подвергнутых алкоголизации 389.9 ± 7.3 г и контрольных особей 419.2 ± 9.7 г.

Животные всех трех экспериментальных групп содержались в одном помещении по 4–5 особей в клетках размером $545 \times 395 \times 200$ мм на подстилках из древесных опилок, в стандартных условиях окружающей среды при относительной влажности 60–70% и температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Комната содержания освещалась 12-часовым циклом искусственного освещения. У всех животных был неограниченный доступ к воде и пище (сухой гранулированный комбинированный корм для грызунов). Все поведенческие тесты и манипуляции с животными осуществлялись в светлую фазу с 09.00–18.00. Экспериментальные процедуры осуществлялись с соблюдением биоэтических норм в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными, утвержденным биоэтическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН и основанном на директиве Европейского Сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными.

Схема эксперимента

В начале эксперимента всех крыс взвешивали и подвергали поведенческому тестированию в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Далее, в течение 3 мес. проводили хроническую алкоголизацию крыс группы 2 в режиме прерывистой алкоголизации свободного выбора. Для оценки уровня предпочтения этанола использовался тест “Двустаканная проба” каждый месяц эксперимента. Через 3 мес. крыс всех групп повторно тестировали в тесте “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Далее животных всех групп обучали выполнять задачи поиска платформы в водном лабиринте Морриса. После декапитации животных, из левой и правой половины мозга крыс выделяли прилежащее ядро, в котором методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли содержание ДА.

Процедура алкоголизации

Формирование предпочтения этанола проводили модифицированным методом прерывистой алкоголизации со свободным выбором [15], где животные группы 2, помимо поилки с водой, также имели доступ к поилке с 20%-ным раствором этанола все дни недели, кроме понедельника и четверга, когда имели доступ только к воде. Для оценки уровня предпочтения этанола использовали суточный “Двустаканный тест”. Тест проводился в привычной клетке, одновременно для всех трех групп крыс, для этого в клетку помещался сепаратор, разделяющий ее на три отсека. В каждый отсек помещались две бутылки: одна с водой, другая с 15%-ным раствором спирта. Фиксировали количество выпитого из каждой бутылки за сутки.

Поведенческие тесты

Для оценки уровня тревоги использовали тест “Приподнятый крестообразный лабиринт”, который представляет из себя поднятый над уровнем пола на 1 м крест с центральной областью 10×10 см и четырьмя рукавами, где каждый рукав имеет длину 50 и ширину 10 см. При этом два рукава открытые, а два других закрытые, с высокими боковыми стенками. Животное помещалось в центр креста и в течение 3 мин фиксировалась длительность пребывания в центре лабиринта, в открытых и закрытых рукавах лабиринта, а также длина пройденного пути в разных отсеках.

Способность к пространственной навигации и формирование пространственной памяти у крыс изучали в водном лабиринте Морриса [16]. Лабиринт представляет из себя круглый бассейн диаметром 1.5 м, заполненный водой комфортной

температуры ($T = 23 \pm 1^\circ\text{C}$). На внутренних стенках бассейна, на равном расстоянии друг от друга, размещены четыре ориентира в виде черных геометрических фигур. Животным было предоставлено две задачи. Первая задача заключалась в поиске видимой платформы, которая располагалась над поверхностью прозрачной воды в одном из секторов бассейна (4 попытки/день в течение 2 дней). Вторая задача заключалась в поиске невидимой платформы, помещенной на 1.5 см ниже уровня непрозрачной воды (с добавлением сухого молока) и расположенной в том же месте, где и в первой задаче (4 попытки/день в течение 3 дней). Проводилась видеозапись поведения животных с последующим анализом трека. Животное запускалось каждый раз из разных точек бассейна. Погружение животного осуществлялось лицом к бортику бассейна. Оба экспериментальных дня первой задачи и первые два дня второй задачи точки старта располагались на уровне геометрических ориентиров. На третий день тестирования точки старта располагались в новых для животного позициях между геометрическими знаками. Если животное не достигало платформы самостоятельно в течение 60 с, то экспериментатор помогал ей подняться на платформу. После каждого заплыва крысы продолжали находиться на платформе 15 с, после чего снимались экспериментатором, вытирались и возвращались в клетку. Самостоятельное достижение платформы считалось критерием успешности выполнения. Фиксировали число ошибочных реализаций, когда животному помогли, кроме того, анализировали время, проведенное животным у стенок бассейна, число актов дефекации в воде, а также, в случаях самостоятельного достижения платформы, анализировали время, затраченное животным для выполнения задания. Бассейн условно разделен на 4 равных сектора воображаемыми линиями, соединяющими геометрические ориентиры на стенках. Сектор, в котором располагается платформа, рассматривается как целевой сектор. Анализировали долю времени, проведенного животным в секторе расположения платформы.

Биохимический анализ

Анализ содержания моноаминов был проведен в лаборатории нейрхимии Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД). Образцы ткани гомогенизировали в 0.1 М хлорной кислоте и центрифугировали при 10000 g и 40°C в течение 30 мин. На анализ брали 20 мкл образца. ВЭЖХ проводили в изократических условиях с использованием обращенно-фазовой колонки (длина алкильной цепи C18) с последующей электрохимической детекцией. Количественное определение уровня дофамина (dopamine, DA) проводилось с применением метода внешнего стандарта. Состав подвижной фазы: 75 мМ фосфатный буфер, содержащий 2 мМ лимонной кислоты (pH 4.6), 0.1 мМ октансульфоновой кислоты и 15%-ный ацетонитрил (V/V). Электрохимическая детекция осуществлялась стеклоуглеродным электродом при 700 мВ. Количество моноаминов в образце выражали в нг/мг белка, затем нормировали на контрольную группу и выражали в % относительно контрольной группы; ошибку пересчитывали как ошибку частного.

Статистический анализ

Результаты экспериментов обрабатывали с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft-Russia). Для оценки нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро–Уилка. При анализе поведенческих параметров сравнение между группами проводили с использованием One-Way ANOVA. В случае обнаружения статистически значимых различий проводилось post hoc сравнение LSD test. Так как не во всех группах данные нейрхимических параметров соответствовали нормальности, для анализа использовали непараметрический тест Краскела–

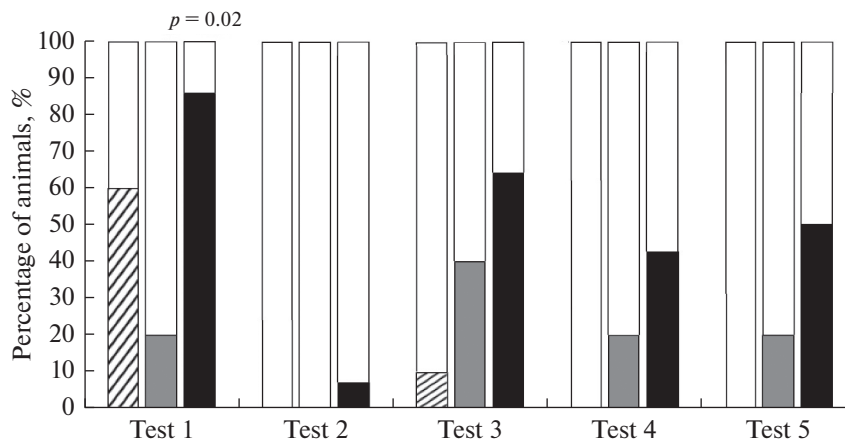


Рис. 1. Доля животных, хотя бы в одной из четырех реализаций каждого теста не нашедших платформу (%). Тест 1–2 – открытая платформа, Тест 3–5 – скрытая платформа. Штриховка – крысы линии Wistar, серый столбик – крысы линии Wistar с хроническим воздействием этанола, черный столбик – крысы DAT-НЕТ. Значимость отличий ($p < 0.05$) указана по критерию Хи-квадрат.

Уоллиса с post-hoc тестом Данна. Для оценки успешности выполнения поведенческого теста в пределах каждой группы использовали критерий Хи-квадрат. Различия полученных результатов считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ успешности выполнения задачи показал, что среди контрольных животных в первом тестировании наблюдается 60% животных, которым хотя бы в одной из 4 реализаций потребовалась помощь экспериментатора в поиске платформы (рис. 1). Незначительный процент таких животных среди контроля наблюдается также в начале обучения новой задаче со скрытой платформой (тест 3). В группе животных с хроническим воздействием алкоголя в четырех тестах (1-, 3-, 4- и 5-й тесты) наблюдается от 20 до 40% таких животных, без выраженной динамики при обучении второй задаче – поиску скрытой платформы. В среднем за все тесты наибольший процент не справившихся хотя бы с одной реализацией теста наблюдается в группе DAT-НЕТ крыс, причем, в первый день обучения их значимо больше, чем справившихся.

Анализ времени достижения платформы показал значимые отличия между крысами DAT-НЕТ и контрольной группой в первый день обучения с открытой платформой (тест 1) и между крысами DAT-НЕТ и крысами, получавшими алкоголь во второй день обучения поиску скрытой платформы (тест 4) (рис. 2). Итоговое тестирование не показало существенных различий между группами.

Анализ времени, проведенном животным в целевом секторе, показал, что крысы, подверженные хроническому воздействию этанола, справлялись хуже контрольной группы только в первые дни обучения новым задачам (тест 1 и тест 3). В итоговых тестах с открытой и закрытой платформой они справлялись значимо лучше, чем гетерозиготы (рис. 3). Крысы группы DAT-НЕТ проводили меньше всего времени в целевом секторе и имели значимое отличие от контроля по этому параметру в 4 из 5 тестов (тесты 1, 2, 3 и 5).

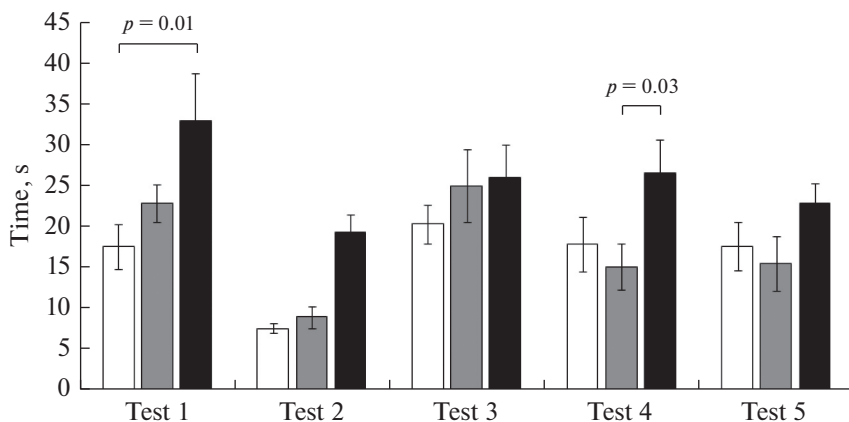


Рис. 2. Время достижения платформы (с) среди животных, справившихся с задачей. Тест 1–2 – открытая платформа, Тест 3–5 – скрытая платформа. Белый столбик – крысы линии Wistar, серый столбик – крысы линии Wistar с хроническим воздействием этанола, черный столбик – крысы DAT-NET. Приведены средние значения \pm ошибка среднего. Указана значимость отличий ($p < 0.05$) post hoc LSD Fisher test.

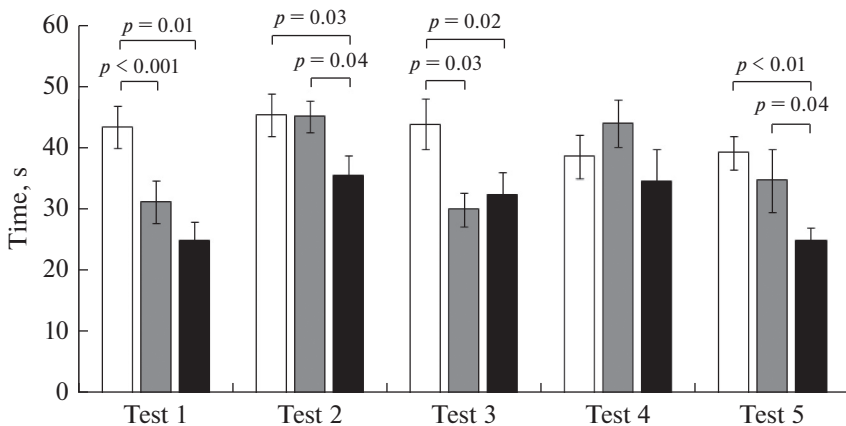


Рис. 3. Доля времени, проведенного в целевом квадрате (%). Тест 1–2 – открытая платформа, Тест 3–5 – скрытая платформа. Белый столбик – крысы линии Wistar, серый столбик – крысы линии Wistar с хроническим воздействием этанола, черный столбик – крысы DAT-NET. Приведены средние значения \pm ошибка среднего. Указана значимость отличий ($p < 0.05$) post hoc LSD Fisher test.

Наблюдения за животными в лабиринте Морриса показали, что они используют разные стратегии поведения. Среди них есть как продуктивные стратегии, такие как целенаправленный поиск по внешним ориентирам, когда животное ищет платформу в непосредственной близости от нее, или же случайный поиск, когда животное использует разнообразные траектории, охватывающие всю площадь бассейна, так и непродуктивные, когда животное не ищет платформу, а просто дрейфует в воде или пытается выбраться из бассейна и плавает непосредственно вдоль стенок, касаясь их лапами. На рис. 4 показано время, проведенное животными

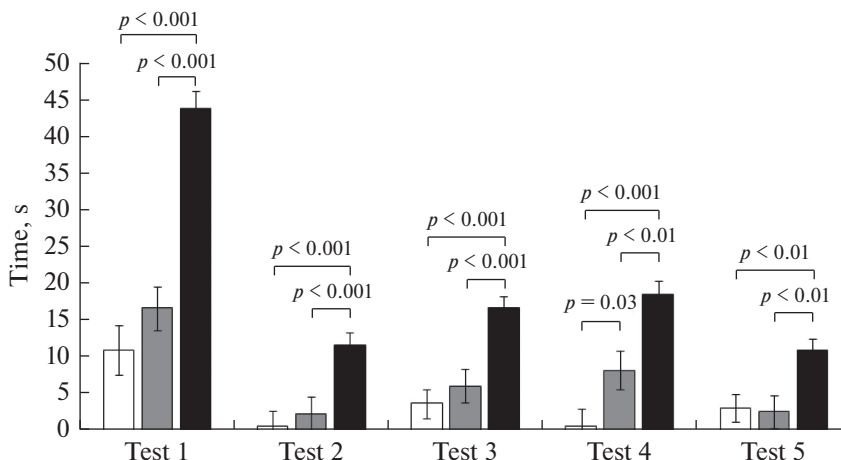


Рис. 4. Время плавания вдоль стен (тигмотаксис) (с). Тест 1–2 – открытая платформа, Тест 3–5 – скрытая платформа. Белый столбик – крысы линии Wistar, серый столбик – крысы линии Wistar с хроническим воздействием этанола, черный столбик – крысы DAT-НЕТ. Приведены средние значения \pm ошибка среднего. Указана значимость отличий ($p < 0.05$) post hoc LSD Fisher test.

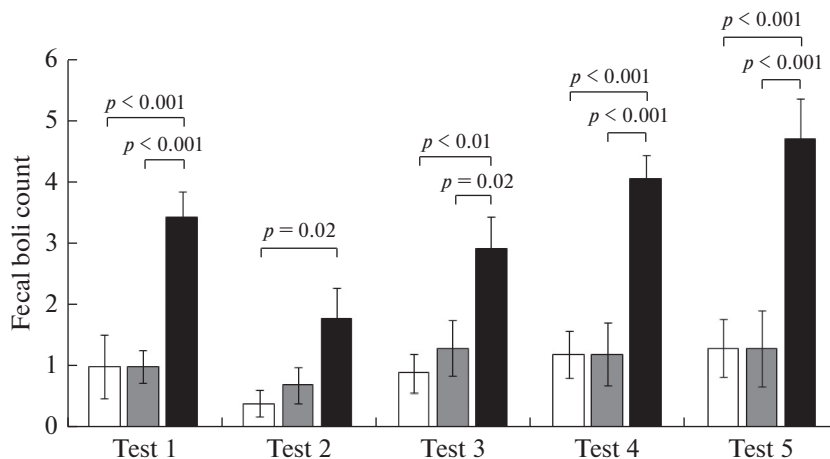


Рис. 5. Количество болюсов (шт.) при обучении в лабиринте Морриса. Тест 1–2 – открытая платформа, Тест 3–5 – скрытая платформа. Белый столбик – крысы линии Wistar, серый столбик – крысы линии Wistar с хроническим воздействием этанола, черный столбик – крысы DAT-НЕТ. Приведены средние значения \pm ошибка среднего. Указана значимость отличий ($p < 0.05$) post hoc LSD Fisher test.

возле стенок бассейна. Было обнаружено, что крысы группы DAT-НЕТ склонны проявлять непродуктивный тигмотаксис и значительно отличаются этим от других групп.

Также для оценки уровня тревоги и реакции на стресс, сопровождающий поиск платформы в бассейне, был проведен анализ числа болюсов, оставляемых животным в воде в процессе плавания (рис. 5). Крысы группы DAT-НЕТ демонстрируют

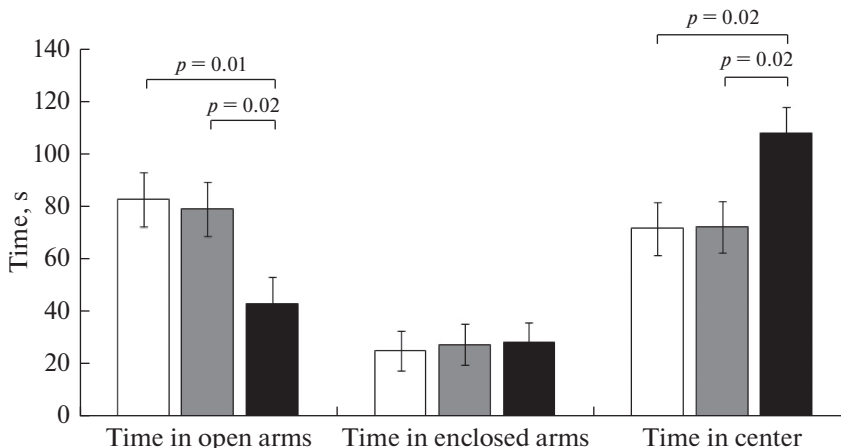


Рис. 6. Время, проведенное в разных отсеках приподнятого крестообразного лабиринта (с). Белый столбик – крысы линии Wistar, серый столбик – крысы линии Wistar с хроническим воздействием этанола, черный столбик – крысы DAT-HET. Приведены средние значения \pm ошибка среднего. Указана значимость отличий ($p < 0.05$) post hoc LSD Fisher test.

существенно более высокий уровень дефекации по сравнению с крысами других групп.

Анализ времени, проведенного в разных отсеках приподнятого крестообразного лабиринта при тестировании перед обучением в водном лабиринте Морриса, показал что крысы DAT-HET отдают большее предпочтение пребыванию в центре лабиринта и проводят меньше времени в открытых рукавах, отличаясь при этом от крыс других групп (рис. 6).

Анализ исследовательской активности, проявляемой в приподнятом крестообразном лабиринте, оценивали по сумме вертикальных стоек и заглядываний вниз в разных отсеках лабиринта. Обнаружено, что несмотря на меньшее время, проводимое в открытых рукавах лабиринта, гетерозиготы проявляют в них больше исследовательской активности (рис. 7).

Анализ уровня дофамина в тканях прилежащего ядра показал значимо более высокий уровень у крыс группы DAT-HET по сравнению с контролем ($p = 0.02$) и тенденцию к превышению по сравнению с получающими алкоголь крысами ($p = 0.07$) (рис. 8).

Крысы, получающие этанол в процессе эксперимента, были разделены на две группы по количеству потребленного спирта в последней двустаканной суточной пробе – условно многопьющие ($n = 5$) и малопьющие ($n = 5$) животные, потреблявшие больше и меньше 2 г/кг этанола. Уровень дофамина в прилежащем ядре значимо отличался у гетерозигот от контроля и от многопьющих крыс и не отличался от малопьющих (рис. 9).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что у крыс гомозигот по нокауту гена дофаминавого транспортера DAT-KO наблюдается значительное увеличение уровня внеклеточного дофамина в стриатуме и снижение его содержания в тканях. При этом у гетерозигот более умеренное увеличение внеклеточного дофамина не сопровождается снижением его в тканях по сравнению с контролем [3]. В нашем эксперименте было обнаружено

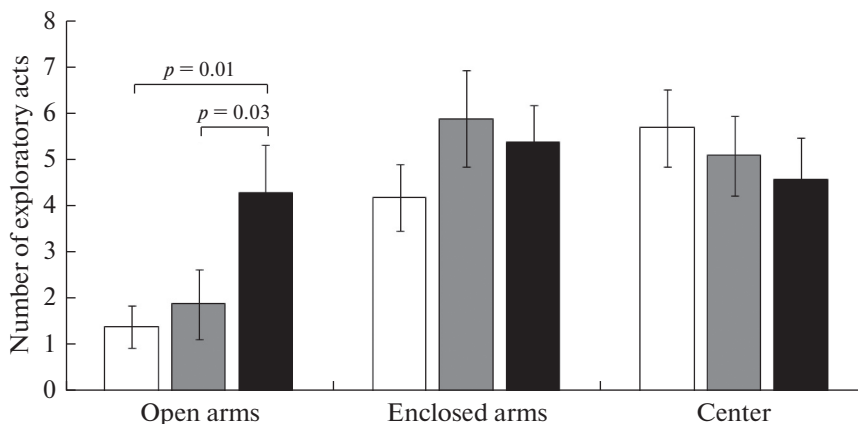


Рис. 7. Количество актов исследовательской активности в разных отсеках приподнятого крестообразного лабиринта (шт.). Белый столбик – крысы линии Wistar, серый столбик – крысы линии Wistar с хроническим воздействием этанола, черный столбик – крысы DAT-HET. Приведены средние значения \pm ошибка среднего. Указана значимость отличий ($p < 0.05$) post hoc LSD Fisher test.

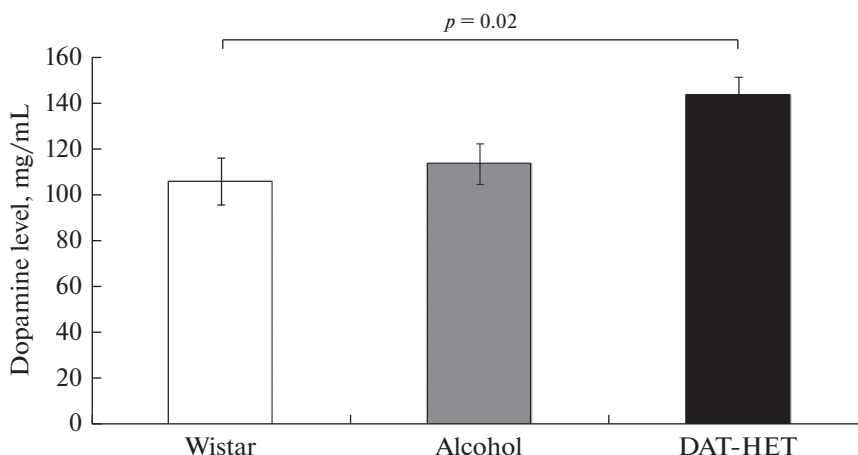


Рис. 8. Уровень дофамина в тканях прилежащего ядра (мг/мл). Белый столбик – крысы линии Wistar, серый столбик – крысы линии Wistar с хроническим воздействием этанола, черный столбик – крысы DAT-HET. Приведены средние значения \pm ошибка среднего. При обнаружении различий между группами приведены значения критерия Краскела–Уоллиса и соответствующий уровень значимости.

превышение уровня дофамина в тканях прилежащего ядра у крыс DAT-HET по сравнению с контролем и по сравнению с многопьющими крысами из группы животных, подвергнутых хронической алкоголизации. Известно влияние различных факторов на уровень дофамина, включая генетические, половые и возрастные отличия [17–19]. Так, исследование уровня стриатного дофамина у мышей гетерозигот по гену транспортера дофамина DAT(+/-) и их контроля – мышей дикого типа DAT(+/+) в различных возрастных периодах показало снижение уровня дофамина с возрастом только у животных дикого типа, в отличие от гетерозигот [19]. Можно

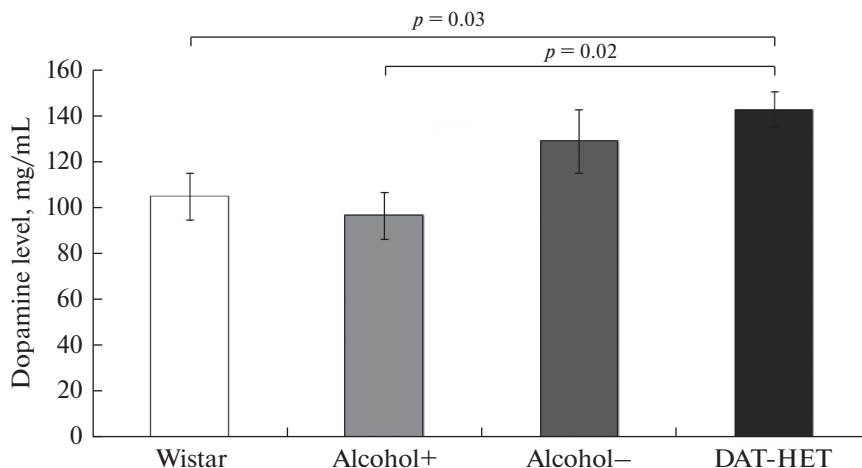


Рис. 9. Уровень дофамина (мг/мл) с учетом разделения на много и малопьющих крыс. Белый столбик – крысы линии Wistar, светло серый столбик – многопьющие крысы линии Wistar с хроническим воздействием этанола, темно-серый столбик – малопьющие крысы линии Wistar с хроническим воздействием этанола, черный столбик – крысы DAT-NET. Приведены средние значения \pm ошибка среднего. При обнаружении различий между группами приведены значения критерия Краскела–Уоллиса и соответствующий уровень значимости.

предположить, что обнаруженное нами преобладание связано с возрастным снижением уровня дофамина у контрольных крыс.

Показано, что экспрессия DAT в прилежащем ядре участвует в регуляции как потребления и предпочтения этанола [20], так и приобретения и извлечения контекстуальной памяти, связанной с этанолом [21]. При этом блокада DAT может снизить подкрепляющие свойства этанола [21]. Показана связь низкого уровня дофамина в стриатуме с высоким уровнем потребления алкоголя [22]. При этом предполагается, что сниженный уровень дофамина в стриатных областях может быть как причиной, так и следствием чрезмерного потребления этанола [23]. В нашем эксперименте обнаружено, что только многопьющие животные имели значимые отличия от гетерозигот в уровне дофамина. По-видимому, только животных, склонных к повышенному потреблению этанола в условиях длительного спаивания, можно рассматривать как модель умеренной гиподофаминергии. В экспериментах с поражением прилежащего ядра иботеновой кислотой было показано, что пространственное обучение поиску скрытой платформы в водном лабиринте Морриса нарушается, но не отменяется. Предполагается роль прилежащего ядра в организации поведения в связи с внешними изменениями [24]. В нашем эксперименте крысы гетерозиготы также успешно обучились обеим задачам: поиску видимой и поиску скрытой платформы. Однако по ряду параметров их поведение отличалось от других групп. Существенным отличием было время, проведенное у стенок бассейна, когда животное пытается выбраться из него, скребя лапами по стенкам и перемещаясь по периметру, а также доля времени, проведенного в целевом секторе. Эти параметры связаны между собой и отражают непродуктивную стратегию поведения, используемую крысами-гетерозиготами. Исследования роли дофаминового транспортера показали, что он участвует в регуляции активности оси гипоталамус–гипофиз–кора надпочечников как на центральном, так и на периферическом уровне. Крысы-самки DAT(–/–) демонстрируют глубокие наруше-

ния регуляции гипофизарного гомеостаза и аномальные вегетативные реакции, в то время как у самок крыс DAT(+/-) обнаруживают незначительные изменения гипофизарных гомеостатических механизмов, которые приводят к повышенной уязвимости к стрессу у самок крыс с частичной делецией DAT [25]. Обучение в водном лабиринте Морриса сопровождается стрессом. Помимо выраженного тигмотаксиса, свидетельством их реакции является существенно более высокий уровень дефекации в бассейне по сравнению с крысами других групп. Сравнительный анализ поведения крыс разных групп в приподнятом крестообразном лабиринте показал неоднозначно трактуемые результаты. Крысы гетерозиготы существенно меньше времени проводили в открытых рукавах лабиринта, но в то же время значительно больше времени находились в центре креста, который также является открытым пространством. В работе Гайнетдинова и соавт. [4] было показано, что крысы DAT-НЕТ в приподнятом крестообразном лабиринте характеризуются повышенной исследовательской активностью и пониженной тревожностью, что выражается в более длительном пребывании в открытых рукавах и меньшим временем нахождения в закрытых рукавах лабиринта. Другая работа также подтвердила более низкий уровень тревожности у гетерозиготных крыс, проявляемый в более длительном их пребывании в светлой камере [26]. Наши данные обнаруживают повышенную исследовательскую активность только в открытых рукавах лабиринта и более длительное пребывание в центре, но сниженную тревожность у гетерозигот не подтверждают. В комплексе с повышенной дефекацией в бассейне это скорее свидетельствует о повышенной реактивности на стресс у этих животных. Мы предполагаем, что именно эта повышенная чувствительность к стрессирующему фактору водного погружения удлиняет период адаптации и препятствует их когнитивному функционированию, замедляя процесс обучения пространственной задаче.

Крысы, хронически получающие алкоголь, не показали разницы в поведенческих параметрах для много- и малопьющих особей. Возможно, это связано с недостаточным количеством животных в таких подгруппах для анализа поведения. В основных параметрах обучения, таких как процент животных, совершающих ошибки, и время достижения платформы, пьющие крысы не отличались от контроля. Однако обнаружено, что в начале обучения каждой новой задаче – как поиску видимой, так и поиску скрытой платформы, пьющие крысы значительно меньше времени проводили в целевом секторе, с выравниванием этого параметра в последующих сессиях. Можно предположить, что это связано с определенной когнитивной ригидностью данных особей. Снижение когнитивной гибкости обнаруживается во многих экспериментах, исследующих влияние хронического потребления алкоголя [27, 28].

В целом исследование позволяет сделать вывод, что разнонаправленная умеренная модуляция активности ДА системы, вызванная различными факторами, не приводит к фатальным нарушениям выполнения задач пространственной навигации, однако влияет на включение собственно механизмов обучения, затрудняя его начало в случае с хроническим употреблением алкоголя, и замедляет весь процесс обучения у крыс DAT-НЕТ в связи с их повышенным эмоциональным ответом на стрессирующий фактор.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Государственной программы, тема № 075-0152-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.В.Ф. — идея, планирование, проведение эксперимента, статистический анализ данных и написание манускрипта. Г.Е.Г. — сбор и обработка экспериментальных данных, подготовка иллюстративного материала. М.В.Д. — сбор экспериментальных данных, редактирование манускрипта, подготовка перевода статьи на английский язык. И.В.А. — сбор экспериментальных данных. А.Ю.Е. — планирование, обсуждение результатов, редактирование манускрипта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Retailleau A, Boraud T* (2014) The Michelin red guide of the brain: role of dopamine in goal-oriented navigation. *Front Syst Neurosci* 8: 32.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00032>
2. *Efimova EV, Gainetdinov RR, Budygin EA, Sotnikova TD* (2016) Dopamine transporter mutant animals: a translational perspective. *J Neurogenet* 30(1): 5–15.
<https://doi.org/10.3109/01677063.2016.1144751>
3. *Leo D, Sukhanov I, Zoratto F, Illiano P, Caffino L, Sanna F, Messa G, Emanuele M, Esposito A, Dorofeikova M, Budygin EA, Mus L, Efimova EV, Niello M, Espinoza S, Sotnikova TD, Hoener MC, Laviola G, Fumagalli F, Adriani W, Gainetdinov RR* (2018) Pronounced Hyperactivity, Cognitive Dysfunctions, and BDNF Dysregulation in Dopamine Transporter Knock-out Rats. *J Neurosci* 38(8): 1959–1972.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1931-17.2018>
4. *Gainetdinov AR, Fesenko ZS, Khismatullina ZR* (2020) Behavioural Changes in Heterozygous Rats by Gene Knockout of the Dopamine Transporter (DAT). *J Biomed* 16 (1): 82–88.
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-1-82-88>
5. *Penner MR, Mizumori SJ* (2012) Neural systems analysis of decision making during goal-directed navigation. *Prog Neurobiol* 96(1): 96–135.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.08.01021964237>
6. *Braun AA, Graham DL, Schaefer TL, Vorhees CV, Williams MT* (2012) Dorsal striatal dopamine depletion impairs both allocentric and egocentric navigation in rats. *Neurobiol Learn Mem* 97(4): 402–408.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.03.004>
7. *Lavoie AM, Mizumori SJ* (1994) Spatial, movement- and reward-sensitive discharge by medial ventral striatum neurons of rats. *Brain Res* 638: 157–168.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90645-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90645-9)
8. *Grinevich VP, Krupitsky EM, Gainetdinov RR, Budygin EA* (2021) Linking Ethanol-Addictive Behaviors With Brain Catecholamines: Release Pattern Matters. *Front Behav Neurosci* 15: 795030.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.79503034975429>
9. *Mcbride WJ, Murphy JM, Lumeng L, Li TK* (1990) Serotonin, Dopamine and Gaba Involvement in Alcohol Drinking of Selectively Bred Rats. *Alcohol* 7: 199–205.
10. *Howard EC, Schier CJ, Wetzel JS, Duvauchelle CL, Gonzales RA* (2008) The shell of the nucleus accumbens has a higher dopamine response compared with the core after non-contingent intravenous ethanol administration. *Neuroscience* 154(3): 1042–1053.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.014>
11. *Budygin EA, Mathews TA, Lapa GB, Jones SR* (2005) Local effects of acute ethanol on dopamine neurotransmission in the ventral striatum in C57BL/6 mice. *Eur J Pharmacol* 523(1–3): 40–45. Epub 2005 Oct 14.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.00616226738>
12. *Mathews TA, John CE, Lapa GB, Budygin EA, Jones SR* (2006) No role of the dopamine transporter in acute ethanol effects on striatal dopamine dynamics. *Synapse* 60(4): 288–294.
<https://doi.org/10.1002/syn.2030116786536>
13. *Carroll MR, Rodd ZA, Murphy JM, Simon JR* (2006) Chronic ethanol consumption increases dopamine uptake in the nucleus accumbens of high alcohol drinking rats. *Alcohol* 40(2):103–109.
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2006.10.003>
14. *Rothblat DS, Rubin E, Schneider JS* (2001) Effects of chronic alcohol ingestion on the mesostriatal dopamine system in the rat. *Neurosci Lett* 300: 63–66.
<https://doi.org/10.1007/s00213-007-0812-1>
15. *Simms JA, Steensland P, Medina B, Abernathy KE, Chandler LJ, Wise R, Bartlett SE* (2008) Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcoholism Clin Exp Res* 32(10): 1816–1823.
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x>

16. *Morris RGM* (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn and Motiv* 12(2): 239–260.
[https://doi.org/10.1016/0023-9690\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5)
17. *Walker QD, Ray R, Kuhn CM* (2006) Sex differences in neurochemical effects of dopaminergic drugs in rat striatum. *Neuropsychopharmacology* 31(6): 1193–1202.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300915>
18. *Haile CN, Kosten TA* (2001) Differential effects of D1- and D2-like compounds on cocaine self-administration in Lewis and Fischer 344 inbred rats. *J Pharmacol Exp Ther* 299(2): 509–518.
19. *Dluzen DE, Ji J, McDermott JL* (2010) Age-related changes in nigrostriatal dopaminergic function in heterozygous mutant dopamine transporter knock-out mice. *Neurosci Lett* 476(2): 66–69.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.004>
20. *Bahi A, Dreyer JL* (2019) No effect of sex on ethanol intake and preference after dopamine transporter (DAT) knockdown in adult mice. *Psychopharmacology (Berl)* 236(4): 1349–1365.
<https://doi.org/10.1007/s00213-018-5144-9>
21. *Bahi A* (2020) Dopamine transporter gene expression within the nucleus accumbens plays important role in the acquisition and reinstatement of ethanol-seeking behavior in mice. *Behav Brain Res* 381: 112475.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112475>
22. *Strother WN, Lumeng L, Li TK, McBride WJ* (2005) Dopamine and serotonin content in select brain regions of weanling and adult alcohol drinking rat lines. *Pharmacol Biochem Behav* 80(2): 229–237.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.11.003>
23. *Kashem MA, Ahmed S, Sarker R, Ahmed EU, Hargreaves GA, McGregor IS* (2012) Long-term daily access to alcohol alters dopamine-related synthesis and signaling proteins in the rat striatum. *Neurochem Int* 61(8): 1280–1288.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.08.013>
24. *Annett LE, McGregor A, Robbins TW* (1989) The effects of ibotenic acid lesions of the nucleus accumbens on spatial learning and extinction in the rat. *Behav Brain Res* 31(3): 231–242.
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(89\)90005-3](https://doi.org/10.1016/0166-4328(89)90005-3)
25. *Illiano P, Bigford GE, Gainetdinov RR, Pardo M* (2020) Rats Lacking Dopamine Transporter Display Increased Vulnerability and Aberrant Autonomic Response to Acute Stress. *Biomolecules* 10(6): 842.
<https://doi.org/10.3390/biom10060842>
26. *Adinolfi A, Zelli S, Leo D, Carbone C, Mus L, Illiano P, Alleva E, Gainetdinov RR, Adriani W* (2019) Behavioral characterization of DAT-KO rats and evidence of asocial-like phenotypes in DAT-HET rats: The potential involvement of norepinephrine system. *Behav Brain Res* 359: 516–527.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.028>
27. *Santín LJ, Rubio S, Begega A, Arias JL* (2000) Effects of chronic alcohol consumption on spatial reference and working memory tasks. *Alcohol* 20(2): 149–159.
[https://doi.org/10.1016/s0741-8329\(99\)00070-1](https://doi.org/10.1016/s0741-8329(99)00070-1)
28. *Matthews DB, Scaletty S, Trapp S, Kastner A, Schneider AM, Schreiber A, Rossmann G* (2022) Chronic Intermittent Ethanol Administration during Adolescence Produces Sex Dependent Impairments in Behavioral Flexibility and Survivability. *Brain Sci* 12(5): 606.
<https://doi.org/10.3390/brainsci12050606>

Comparative Study of the Behavior after Long-Term Ethanol Consumption Wistar Rats and Dopamine Transporter Heterozygous Rats in the Morris Water Maze

E. V. Filatova^{a, *}, G. E. Gromova^a, M. V. Dorofeikova^a, I. V. Antonova^a, and A. Y. Egorov^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Saint Petersburg, Russia*

**e-mail: filena17@gmail.com*

Dysfunctions of the dopaminergic system are the basis of many neuropsychiatric diseases. Dopamine transporter heterozygous (DAT-HET) rats are a promising model of a moderate increase in the activity of the dopaminergic system. They are characterized by higher motor activity and cognitive impairments, which allow them to be considered as a possible model of pathologies such as attention deficit hyperactivity disorder. It is known that chronic ethanol consumption leads to dopamine depletion, particularly in the striatum. We suggest that chronically ethanol-consuming rats may serve as a model of mod-

erate hypodopaminergic state, as opposed to DAT-HET rats. The aim of this study was to explore the effect of such modulations of the dopaminergic system on learning and spatial navigation in the Morris water maze. A decrease in dopamine levels compared to DAT-HET rats was found only in rats with a higher level of ethanol preference. In the Morris water maze, the DAT-HET rats showed an unproductive strategy of thigmotaxis significantly more than the ethanol-consuming rats, which led to slower learning. It is possible that the observed impairments in the learning of the spatial task are related to their reaction to stress, manifested, in particular, by a high level of defecation in the pool. Rats after the chronic ethanol exposure demonstrated a delayed purposeful search for a platform in comparison with the control group, which was expressed in less time spent in the target sector at the beginning of each learning session.

Keywords: dopamine transporter heterozygous rats, Morris water maze, chronic ethanol consumption

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ
ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БИОСЕНСОРЫ
ХЛОРА И ВОДОРОДА

© 2022 г. Ю. Н. Давидюк^{1, *}, А. Х. Юсупова²,
Е. О. Петухова^{1, 2}, П. Д. Брежестовский^{2, 3, **}

¹*Институт фундаментальной медицины и биологии,
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

²*Институт нейронаук, Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия*

³*Institut de Neurosciences des Systemes, Aix-Marseille University, INSERM, INS, Marseille, France*

*E-mail: davi.djuk@mail.ru

**E-mail: pbreges@gmail.com

Поступила в редакцию 07.07.2022 г.

После доработки 12.09.2022 г.

Принята к публикации 13.09.2022 г.

Модели с генетическими манипуляциями животных получили широкое применение в разных областях медицины и биологических исследованиях. В последние десятилетия были созданы тысячи генетически модифицированных трансгенных моделей мышей, и их производство ускоряется. Поэтому важной проблемой является поддержание и контроль генетической чистоты линий. В наших исследованиях используются линии трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах генетически кодируемые зонды для неинвазивной регистрации ионов хлора (“Cl-Sensor”) и одновременной регистрации хлора и водорода (“ClorHensor”). Для поддержания чистоты этих линий нами разработана тест-система для генотипирования трансгенных мышей. Подход характеризуется высокой достоверностью результатов и может быть использован для проведения дальнейшего контроля за генетической чистотой этих линий, а также контроля линий животных с незначительно различающимися участками аминокислотных последовательностей.

Ключевые слова: трансгенные линии, сенсоры хлора и водорода, генетический контроль, ПЦР

DOI: 10.31857/S086981392210003X

В последние десятилетия в рамках исследований в области фотофармакологии и оптосенсорики все шире применяются модели на основе генетически модифицированных линий млекопитающих, в частности лабораторных мышей [1–3]. При этом важной проблемой является поддержание и контроль генетической чистоты линий, так как на нее могут влиять ряд факторов [4]. Генетически модифицированные мыши могут изменять функцию гена путем сверхэкспрессии, элиминации или модификации генного продукта [5, 6]. В частности, было показано, что мутационный процесс в отдельных линиях мышей может приводить к делециям, инсерциям или локальным мутациям, вследствие чего аллели могут не только утратить свои функции, но и приобрести гипоморфный или гиперморфный характер [7]. Также нельзя исключать вероятность случайного скрещивания особей, содержа-

щих различные гены, вследствие чего перед проведением исследований необходимо убедиться в чистоте популяции [4, 8, 9]. Кроме того, необходимо учитывать человеческий фактор при поддержании линий лабораторных животных, который может приводить к смешению линий и появлению гибридного потомства [10]. Поэтому в лабораторной практике применяется ряд методов генотипирования особей поддерживаемых линий [11, 12]. Так, для идентификации и контроля генетической чистоты линий мышей предложены методы ПЦР-анализа и секвенирования коротких tandemных повторяющихся последовательностей [4, 9], ПЦР-анализа и Саузерн-блоттинга геномной ДНК [6, 13], флуоресцентной микроскопии [14].

Таким образом, постоянный контроль генетической чистоты является необходимой процедурой при проведении исследований с использованием трансгенных линий мышей [4, 6]. В наших исследованиях используются созданные ранее линии трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах генетически кодируемые зонды для неинвазивной регистрации ионов хлора (“Cl-Sensor”) [15, 20, 22, 23] и одно-временной регистрации хлора и водорода (“ClorHensor”) [15, 16]. Эти зонды созданы на базе производных зеленого флуоресцентного белка и имеют пересекающиеся спектральные характеристики, а также незначительно различающиеся участки аминокислотных последовательностей [17]. В процессе работы произошло смешивание этих линий и возникла задача их надежного разделения. Поэтому целью исследования была разработка тест-системы для генотипирования используемых линий, обеспечивающей высокую достоверность результатов. Поскольку до настоящего времени тест-системы для генотипирования данных линий разработаны не были, наша тест-система является первой, предназначенной для решения поставленной задачи, что придает исследованию особую ценность.

Современные технологии геномной инженерии позволяют манипулировать геномами животных, обеспечивая платформу для создания все более сложных способов моделирования болезней, а также биосенсорных систем для контроля многих биологических компонент. За последние десятилетия были созданы тысячи генетически модифицированных трансгенных линий мышей [8]. Этот процесс требует все более тщательного контроля поддержания чистоты создаваемых линий животных. Предлагаемая нами тест-система является одним из простых и эффективных подходов которые могут быть использованы для поддержания линий трансгенных животных экспрессирующих генетически кодируемые биосенсоры.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трансгенные линии мышей, экспрессирующих “Cl-Sensor” и “ClorHensor”

Биологическим материалом для ПЦР-исследования служили трансгенные мыши в возрасте от 2 мес. до 1 года линий “Cl-Sensor” и “ClorHensor”, различающиеся последовательностью конструкта, встроенного в локус *ROSA26* 6-й хромосомы мышинного генома [42] и экспрессирующегося в нейронах (рис. 1).

Cl-Sensor – это генетически сконструированный белок, состоящий из цианового флуоресцентного белка (CFP) и желтого флуоресцентного белка (YFP), соединенных гибким линкером из 20 аминокислот (рис. 1а). CFP является референтным белком, а YFP – сенсором хлора, флуоресценция которого уменьшается при повышении концентрации этого аниона. Три мутации в последовательности YFP придают ему высокую чувствительность к хлору ($IC_{50} \approx 30$ мМ), что позволяет проводить измерения в физиологическом диапазоне внутриклеточных концентраций аниона [20].

ClorHensor состоит из модифицированного зеленого флуоресцентного белка E²GFP и красного флуоресцентного белка DsRed-m, соединенных гибким линкером, отличающимся по аминокислотному составу от используемого в Cl-Sensor

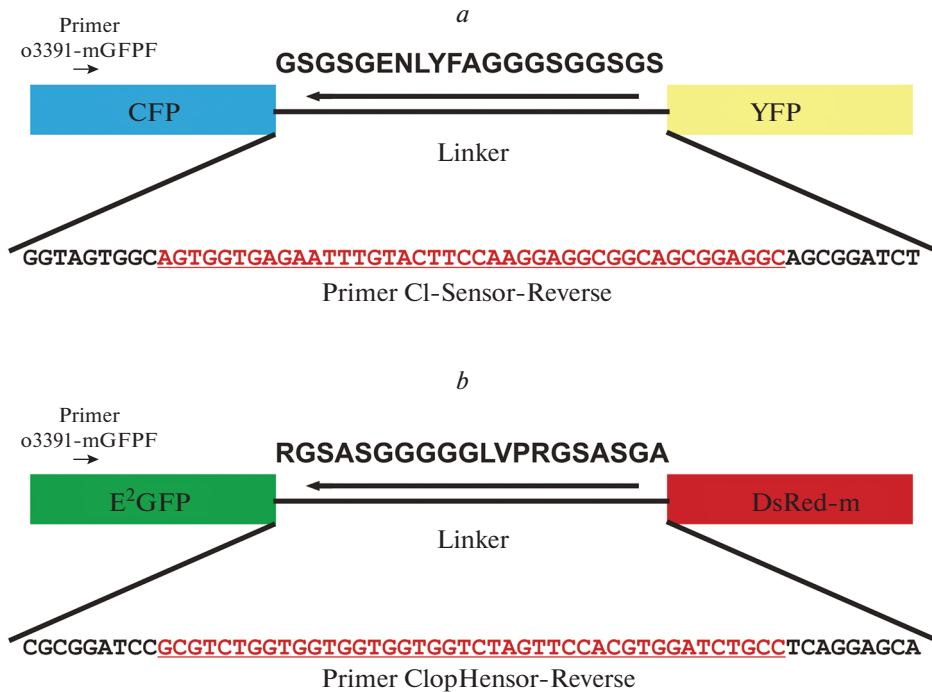


Рис. 1. Схема генетических конструкций экспрессированных в нейронах трансгенных мышей: *a* – CI-Sensor; *b* – ClorHensor. Стрелками указана локализация сайтов отжига праймеров (без соблюдения масштаба). Последовательности сайтов отжига обратных праймеров выделены красным шрифтом.

(рис. 1b). В данной конструкции E²GFP является сенсором хлора, а DsRed-m – референтным белком, применяемым для ратиометрических измерений pH и концентрации ионов хлора в цитоплазме [17, 21].

Регистрация хлор-специфичного сигнала осуществляется путем расчета отношения интенсивности эмиссии при облучении сенсора светом с длиной волны 458 нм (изобестическая точка, в которой пересекаются спектры возбуждения при различных значениях pH) к интенсивности эмиссии при облучении светом с длиной волны более 560 нм (референтному диапазону красного флуоресцентного белка). Наличие изобестической точки pH при 458 нм обеспечивает одновременную регистрацию двух ионов (Cl⁻ и H⁺).

Спектр возбуждения ClorHensor имеет два заметных пика с максимумами около 515 и 560 нм, соответствующие E²GFP и DsRed-m [17]. В целом, спектральные изменения ClorHensor идеально подходят для ратиометрической работы в трех диапазонах длин волн возбуждения: ≈458, 490–510 и 560–590 нм.

Линии мышей были получены с использованием нейронального промотора Thy1, который стимулирует устойчивую экспрессию в различных типах нейронов центральной нервной системы [24–26], следуя процедурам, которые описаны ранее [15, 16]. Для получения линий мышей, экспрессирующих CI-Sensor и ClorHensor использовали штамм лабораторных мышей C57BL/6.

Все процедуры с животными одобрены локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета (№ 10; 20.12.2016). Животные

Таблица 1. Последовательности праймеров для проведения генотипирования трансгенных мышей линий “Cl-Sensor” и “ClpHensor” методом ПЦР

Шифр праймера	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	Длина, нуклеотиды
o3391-mGFPF	ccctgaagttcatctgcacc	20
Cl-Sensor-Reverse	gcctccgctgccgccttctggaagtacaaattctcaccact	42
ClpHensor-Reverse	ggcagatccacgtggaactagaccaccaccaccagacgc	42

содержались при естественном освещении и температуре воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$ с постоянным доступом к комбинированному корму и воде.

ПЦР анализ смешанной популяции трансгенных мышей

Для выделения ДНК использовали фрагменты ушей и хвостов длиной 3–5 мм, которые хранили при температуре -20°C . Выделение общей ДНК проводили с использованием набора реагентов “QIAamp DNA MiniKit” (Qiagen, Германия) согласно рекомендациям производителя. Определение концентрации выделенной ДНК проводили с помощью бескуветного спектрофотометра NanoDropND-1000 (ThermoFisherScientific, США).

Для проведения генотипирования особей был использован метод ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. В качестве прямого праймера был использован праймер o3391-mGFPF [16] и рассчитаны последовательности обратных праймеров для ПЦР, соответствующие линкерным участкам генетических конструкторов (табл. 1).

ПЦР проводили с использованием реакционной смеси “ScreenMix” (Евроген, Россия) на термоциклере C1000 (Bio-Rad, США). Для проведения ПЦР готовили реакционную смесь объемом 10 мкл состава: $5 \times$ ScreenMix – 2.0 мкл, прямой праймер (20 мкМ) – 0.1 мкл; обратный праймер (20 мкМ) – 0.1 мкл, препарат ДНК (7–20 нг) – 0.3 мкл; H_2O – 7.5 мкл.

После ряда этапов оптимизации ПЦР-амплификацию проводили по следующей программе: 1) 94°C – 2 мин; 2) 35 циклов: 94°C – 30 с; 55°C – 30 с; 72°C – 45 с; 3) 72°C – 5 мин; 4) 10°C – ∞ .

Продукты ПЦР-амплификации разделяли методом гель-электрофореза в 1.0%-ном агарозном геле с использованием электрофорезной горизонтальной системы Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad, США) и документировали с помощью системы мультиплексной визуализации GelDoc XR+ (Bio-Rad, США).

Приготовление переживающих срезов мозга и их визуализация

Анестезированных изофлураном мышей декапитировали, головной мозг извлекали и помещали в ледяной раствор с высоким содержанием калия следующего состава: 120 мМ К-глюконат, 10 мМ HEPES-acid, 15 мМ Na-глюконат, 0.2 мМ EGTA и 4 мМ NaCl (pH 7.2, 290–300 мОсм/л). По истечении одной минуты выделяли большие полушария головного мозга и монтировали для приготовления сагиттальных срезов (350 мкм) на моторизованном вибротоме NVSLM (World Precision Instruments, США). Приготовление срезов осуществляли в ледяном растворе с высоким содержанием калия. Готовые срезы помещали на 20 мин в инкубационную камеру с раствором искусственной цереброспинальной жидкости (ACSF) с повышенным содержанием магния (в мМ): NaCl – 126; KCl 3.5; NaH_2PO_4 – 1.2; глюкоза 10; NaHCO_3 – 25; MgCl_2 – 10; CaCl_2 – 0.5 (pH 7.3–7.4 при постоянной оксигенации карбогеном; 290–300 мОсм/л, комнатная температура), после чего в течение как

минимум часа инкубировали в нормальном ACSF (в mM): NaCl — 126; KCl — 3.5; NaH₂PO₄ — 1.2; глюкоза — 10; NaHCO₃ — 25; MgCl₂ — 1.3; CaCl₂ — 2 (pH 7.3–7.4 при постоянной оксигенации карбогеном; 290–300 мОсм/л, комнатная температура).

Срезы визуализировали при помощи прямого флуоресцентного микроскопа Olympus BX51WI, оборудованного водно-иммерсионными объективами ×10 и ×60, видеокамерой iXon Life 897 EMCCD (Andor, Oxford Instruments, Великобритания), четырехканальным светодиодным источником света (LED4D001, Thorlabs, США), 4-канальным драйвером для светодиодов (DC4100, Thorlabs, США) и набором четырехполосных фильтров (Chroma, Foothill Ranch, США). Управление компонентами установки осуществляли при помощи программного обеспечения Micro-Manager [18] или DriverLed (Казанский государственный медицинский университет, Казань). Эмиссию флуоресцентных белков в составе сенсоров индуцировали путем облучения светом с длинами волн 455, 505 и 590 нм. Экспозиция съемки при получении изображений составляла от 30 до 500 мс.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разделение линий с помощью ПЦР-анализа

Всего были выделены ДНК от 227 особей трансгенных мышей. Концентрация выделенной ДНК составила 25–77 нг/мкл. Для всех выделенных ДНК была проведена ПЦР-амплификация целевого участка генома с целью генотипирования особей трансгенных мышей.

В результате ПЦР-амплификации были получены продукты длиной приблизительно 650–700 пар нуклеотидов (пн), что близко к ожидаемой длине 644 и 638 пн для “Cl-Sensor” и “ClorHensor” соответственно. Примеры результатов разделения продуктов ПЦР-амплификации участков ДНК некоторых особей трансгенных мышей представлены на рис. 2 и 3.

ПЦР-продукт, соответствующий ожидаемому для генетически чистой линии “ClorHensor”, образовался у образцов а-2, а-4, а-7, а-8, а-9. У образцов а-41, а-42, а-43, а-44, а-24 образовались ПЦР-продукты, соответствующие линиям “ClorHensor” и “Cl-Sensor”, т.е. эти особи являются носителями гибридных геномов (рис. 2).

ПЦР-продукт, соответствующий ожидаемому для генетически чистой линии “Cl-Sensor”, образовался у образцов а-100, а-105 — а-109, а-112, а-113, а-115. У образцов а-96, а-95 — а-99, а-114, а-116 образовались ПЦР-продукты, соответствующие линиям “ClorHensor” и “Cl-Sensor”, т.е. эти особи являются носителями гибридных геномов (рис. 3).

Проверка надежности разделения линий трансгенных мышей

Для дополнительной проверки надежности результатов генотипирования линий было использовано два подхода: (i) случайное секвенирование ПЦР-продуктов и (ii) визуализация флуоресцентных сигналов в срезах мозга.

Для валидации результатов генотипирования в Междисциплинарном центре протеомных исследований КФУ на секвенаторе ABI PRISM 310 с использованием набора реагентов “Big Dye Terminator 3.1 sequencing kit” (ABI, США) было проведено случайное секвенирование по Сэнгеру ПЦР-продуктов, полученных от 6 особей, идентифицированных, как относящихся к линиям “Cl-Sensor” и “ClorHensor”. Для секвенирования были использованы праймеры o3391-mGFPP и o3392-mGFPR [16]. Результаты, полученные методом секвенирования, во всех случаях совпали с результатами генотипирования методом ПЦР-анализа (рис. 4).

Также с применением методов флуоресцентной микроскопии была проведена визуализация экспрессии сенсоров в нейронах срезов гиппокампа мышей геноти-

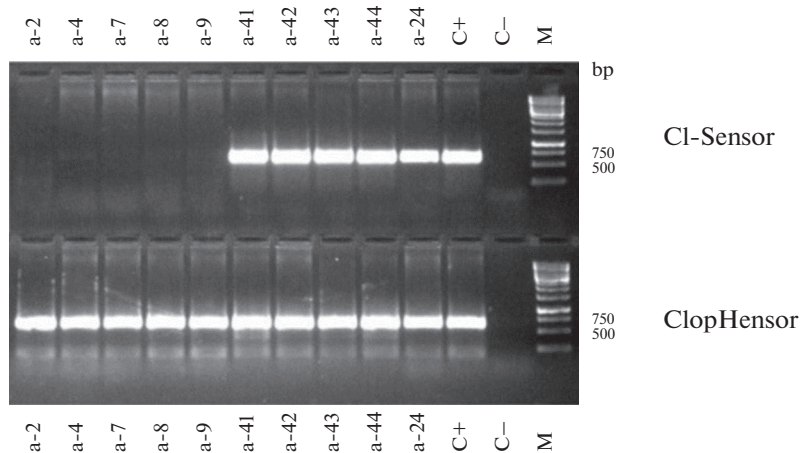


Рис. 2. Электрофореграмма результатов разделения с использованием детекции ПЦР-продуктов методом гель-электрофореза: а-2–а-24 – номера образцов, С+ – положительный контроль, С– – отрицательный контроль, М – маркер длин фрагментов ДНК (GeneRuler 1 kb DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США)).

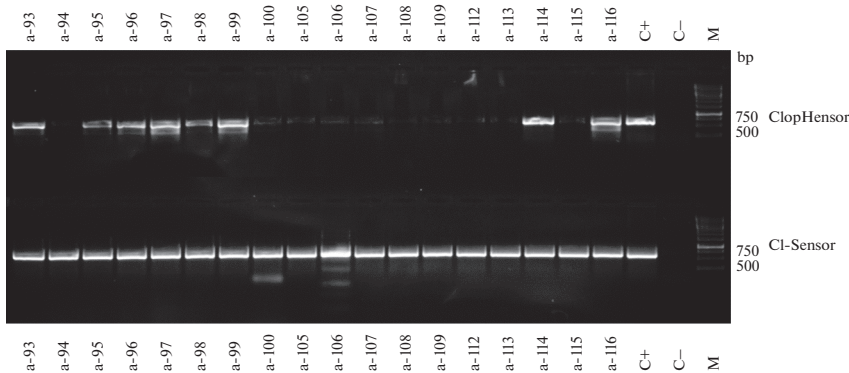


Рис. 3. Электрофореграмма результатов разделения с использованием детекции ПЦР-продуктов методом гель-электрофореза: а-93–а-116 – номера образцов, С+ – положительный контроль, С– – отрицательный контроль, М – маркер длин фрагментов ДНК (GeneRuler 1 kb DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США)).

пированных особей. Принципиальным отличием линий мышей, экспрессирующих “ClopHensor”, является наличие белка DsRed-m, светящегося в красном диапазоне длин волн, в то время как при более коротких длинах волн флуоресцентные сигналы пересекаются. Поэтому проводилась регистрация хлор- и рН-специфичных сигналов, появляющихся при последовательном облучении срезов возбуждающим светом со следующими длинами волны: 590, 505 и 455 нм [19]. На рис. 5 представлены микрофотографии переживающих срезов мозга мыши линии “ClopHensor” на уровне CA1 зоны гиппокампа. Сенсор визуализируется на всех трех каналах.

Majority	AGACCCGGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGCACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC
	10 20 30 40 50 60 70 80
constuct ClopHensor
a-17
a-20
construct CI-sensor
a-47
a-48
a-49
a-50
Majority	GGCAACATCTCGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACATCAGCCACACGCTCTATATCACCGGCCACAGCAGAAGAACGG
	90 100 110 120 130 140 150 160
constuct ClopHensorA.TG.
a-17A.TG.
a-20A.TG.
construct CI-sensor
a-47
a-48
a-49
a-50
Majority	CATCAAGGCCAACTTCAAGATCCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCC
	170 180 190 200 210 220 230 240
constuct ClopHensorTG.
a-17TG.
a-20TG.
construct CI-sensor
a-47
a-48
a-49
a-50
Majority	CCATCGGGCGACGGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAG
	250 260 270 280 290 300 310 320
constuct ClopHensorTA.
a-17TA.
a-20TA.
construct CI-sensor
a-47
a-48
a-49
a-50
Majority	AAGCGGATCACATGGTCTCTGGAGTTCGTGACCCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGGACGAGCTGTACAAGTCCGG
	330 340 350 360 370 380 390 400
constuct ClopHensorCG.
a-17CG.
a-20CG.
construct CI-sensor
a-47
a-48
a-49
a-50
Majority	AGGTAGTGGCAGTGGTGAATT-TGTAATTCCAAGGAG
	410 420 430
constuct ClopHensorTCCGCGTCTG.GTGG.GG.C..G....C.TG.
a-17TCCGCGTCTG.GTGG.GG.C..G....C.TG.
a-20TCCGCGTCTG.GTGG.GG.C..G....C.TG.
construct CI-sensor
a-47
a-48
a-49
a-50

Рис. 4. Нуклеотидные последовательности секвенированного участка генома мышей линий “CI-Sensor” и “ClopHensor” и соответствующих генетических конструкций: a-17, a-20, a-47, a-48, a-49, a-50 – образцы.

Поскольку CI-Sensor, состоящий из цианового флуоресцентного белка и модифицированного желтого флуоресцентного белка, не обладает эмиссией в красной области спектра, чистота трансгенной линии “CI-Sensor” была подтверждена отсутствием флуоресцентного сигнала при возбуждении волнами света длиной 590 нм и одновременным наличием флуоресценции на каналах 505 и 455 нм (рис. 5).

Следовательно, мыши, идентифицированные по результатам генотипирования как относящиеся к линиям “CI-Sensor” или “ClopHensor”, продемонстрировали соответствующие спектры флуоресценции в нейронах головного мозга.

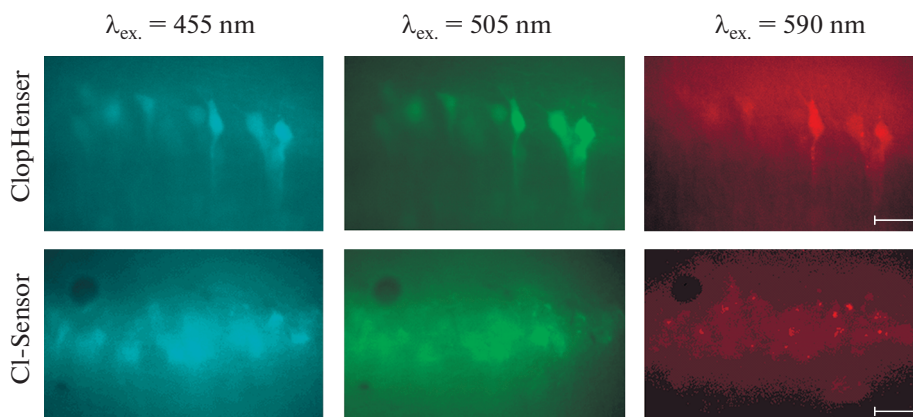


Рис. 5. Микрофотографии переживающих срезов мозга на уровне CA1 зоны гиппокампа, полученных от мыши, экспрессирующей ClopHensor (возраст – 6 дней) и мыши, экспрессирующей Cl-Sensor (возраст – 5 мес.). Эмиссию регистрировали при облучении препаратов возбуждающим светом со следующими длинами волн: 455, 505 и 590 нм. У мышей, экспрессирующих Cl-Sensor, отсутствует специфичная для ClopHensor эмиссия в красной части спектра. Масштабная линейка – 25 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Главной платформой для моделирования заболеваний человека в биомедицинских исследованиях являются грызуны, прежде всего трансгенные мыши [28, 30, 32]. Благодаря секвенированию генома этого вида животных, появилась возможность создавать линии трансгенных мышей со встроенными или удаленными генетически белками, или другими генетически кодируемыми молекулами [2, 27, 31]. Были созданы тысячи генетически модифицированных трансгенных линий мышей, в частности экспрессирующих конструкции, основанные на разных вариантах зеленого флуоресцентного белка [29, 36–38] и биосенсоры [15, 16, 33, 34].

Разведение и содержание генетически модифицированных мышей требует точного и тщательного контроля генетической чистоты линий. Особые условия содержания могут быть важны, в зависимости от характера мутаций. Например, мышей с ослабленным иммунитетом необходимо содержать в строгих условиях, свободных от специфических патогенов, предпочтительно в барьерном помещении [39]. Неожиданные проблемы с разведением и поддержанием чистоты линий животных могут возникнуть несмотря на все усилия по созданию подходящих и специфичных условий разведения и содержания. Диагностировать проблему сложно, так как она, вероятно, является результатом сочетания ряда факторов, таких как мутационные/трансгенные эффекты, факторы окружающей среды, острые или хронические заболевания [40].

Часто генетическим фоном выбора для содержания генетически модифицированных мышей является C57BL/6. Тем не менее, может быть необходимо или даже предпочтительно поддерживать трансгенную линию на другом гибридном фоне, чтобы облегчить проблемы размножения или справиться с поддержанием популяции.

Как указывалось, ряд спонтанных процессов в геноме трансгенных особей, а также обстоятельства, связанные с человеческим фактором, могут приводить к появлению в популяции особей с геномом, отличающимся от гомозиготного генома исходных линий. Поэтому постоянный контроль за генетической чистотой линий является абсолютно необходимым. Проведение такого контроля представляется

особенно важным в случае одновременного поддержания линий, содержащими близкие генетические конструкции. Поэтому важной задачей является выбор метода генотипирования, позволяющего быстро и надежно различать особей с близкими, но разными генотипами. При этом желательно также, чтобы метод отличался простотой и дешевизной.

В настоящее время для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов широко используется метод аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР), позволяющий различать аллели гена, отличающиеся на один нуклеотид, и дающий возможность легкого определения гомо- и гетерозигот. Ранее этот метод был использован нами для определения генотипа по мутации 1911A > G в гене *TRPV1* человека [41]. Поскольку основной сложностью задачи нашего исследования было различение гомо- и гетерозиготных особей, то для генотипирования особей линий “Cl-Sensor” и “ClorHensor” был выбран метод ПЦР в его модификации, аналогичной АС-ПЦР. Выбор метода был связан, в первую очередь, с его эффективностью и достоверностью результатов генотипирования. Немаловажными преимуществами выбранного метода является также относительная дешевизна реагентов и оборудования, достаточно высокая производительность, быстрота определения и отсутствие необходимости в высокой квалификации персонала.

Для проведения ПЦР нами были рассчитаны последовательности обратных праймеров, соответствующие нуклеотидной последовательности линкерных участков генетических конструкций “Cl-Sensor” и “ClorHensor” (рис. 1 и табл. 1). Значение идентичности нуклеотидной последовательности линкеров этих конструкций составило 56%, что позволило достичь достаточной специфичности при проведении ПЦР, подтвержденной результатами секвенирования (рис. 4).

Основным недостатком выбранного метода является возможное получение ложноположительных результатов ПЦР. Для уменьшения их количества и достижения в перспективе 100%-ной специфичности ПЦР было проведено несколько этапов оптимизации реакции, в ходе которых были подобраны оптимальные температура отжига и количество циклов амплификации, позволяющие достичь достаточной достоверности результатов. Тем не менее, в ходе дальнейшей оптимизации мы планируем достичь полного исключения ложноположительных результатов тестирования.

Таким образом, разработанная тест-система обеспечила достаточную достоверность результатов генотипирования и может быть использована как для разделения особей трансгенных мышей линий “Cl-Sensor” и “ClorHensor” и их гибридов, так и для проведения генетического контроля при поддержании этих линий. Вероятно, аналоги разработанной тест-системы могут быть использованы и для выполнения таких же задач для других линий трансгенных мышей с малоразличающимися по нуклеотидной последовательности генетическими конструкциями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная тест-система для генотипирования трансгенных мышей линий “Cl-Sensor” и “ClorHensor” характеризуется высокой достоверностью результатов и может быть использована для проведения дальнейшего контроля за генетической чистотой линий, а также контроля линий животных с участками, незначительно различающимися по нуклеотидной последовательности.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках проекта РНФ № 18-15-00313 “Разработка фотофармакологических подходов для коррекции тормозных процессов в центральной нервной системе

при неврологических заболеваниях”, а также в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента (Ю.Н.Д., П.Д.Б.), сбор данных (А.Х.Ю., Е.О.П.), обработка данных (Ю.Н.Д., А.Х.Ю.), написание статьи и редактирование текста (Ю.Н.Д., А.Х.Ю., Е.О.П., П.Д.Б.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Asrican B, Augustine GJ, Berglund K, Chen S, Chow N, Deisseroth K, Feng G, Gloss B, Hira R, Hoffmann C, Kasai H* (2013) Next-generation transgenic mice for optogenetic analysis of neural circuits. *Front Neural Circuits* 7: 160.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00160>
2. *Ting JT, Feng G* (2013) Development of transgenic animals for optogenetic manipulation of mammalian nervous system function: progress and prospects for behavioral neuroscience. *Behav Brain Res* 255: 3–18.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.037>
3. *Partridge JG* (2015) Utilizing GCaMP transgenic mice to monitor endogenous G_q/11-coupled receptors. *Front Pharmacol* 6: 42.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00042>
4. *Almeida JL, Dakic A, Kindig K, Kone M, Letham DLD, Langdon S, Peat R, Holding-Pillai J, Hall EM, Ladd M, Shaffer MD, Berg H, Li J, Wigger G, Lund S, Steffen CR, Fransway BB, Geraghty B, Natoli M, Bauer B, Gollin SM, Lewis DW, Reid Y* (2019) Interlaboratory study to validate a STR profiling method for intraspecies identification of mouse cell lines. *PLoS One* 14(6): e0218412.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218412>
5. *Silva AJ, Simpson EM, Takahashi JS, Lipp HP, Nakanishi S, Wehner JM, Giese KP, Tully T, Abel T, Chapman PF, Fox K* (1997) Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Neuron* 19(4): 755–759.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80958-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80958-7)
6. *Haruyama N, Cho A, Kulkarni AB* (2009) Overview: engineering transgenic constructs and mice. *Current Protocol Cell Biol* 42: 19.10.1–19.10.9.
<https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1910s42>
7. *Benavides F, Rüllicke T, Prins J-B, Bussell J, Scavizzi F, Cinelli P, Herault Y, Wedekind D* (2020) Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats: FELASA Working Group Report 54(2): 135–148.
<https://doi.org/10.1177/0023677219867719>
8. *Linder CC* (2003) Mouse nomenclature and maintenance of genetically engineered mice. *Compar Med* 53(2): 119–125.
9. *Almeida JL, Hill CR, Cole KD* (2014) Mouse cell line authentication. *Cytotechnology* 66: 133–147.
<https://doi.org/10.1007/s10616-013-9545-7>
10. *Lusis AJ, Yu J, Wang SS* (2007) The Problem of Passenger Genes in Transgenic Mice. *Am Heart Assoc* 27: 2100–2103.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.147918>
11. *Dennis MB* (2002) Welfare issues of genetically modified animals. *ILAR J* 43(2): 100–109.
<https://doi.org/10.1093/ilar.43.2.100>
12. *Wolfer DP, Crusio WE and Lipp HP* (2002) Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci* 25(7): 336–340.
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02192-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02192-6)
13. *Costinean S, Zanasi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, Croce CM* (2006) Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in Eμ-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18): 7024–7029.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602266103>
14. *Takada T, Awaji T, Itoh K, Takahashi R, Shibui A, Yoshida K, Sugano S, Tsujimoto G* (1997) Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nature Biotechnol* 15(5): 458–461.
<https://doi.org/10.1038/nbt0597-458>

15. *Batti L, Mukhtarov M, Audero E, Ivanov A, Paolicelli RC, Zurborg S, Gross C, Bregestovski P, Heppenstall PA* (2013) Transgenic mouse lines for non-invasive ratiometric monitoring of intracellular chloride. *Front Mol Neurosci* 6: 11.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00011>
16. *Diuba AV, Samigullin DV, Kaszas A, Zonfrillo F, Malkov A, Petukhova E, Casini A, Arosio D, Escalapez M, Gross CT, Bregestovski P* (2020) CLARITY analysis of the Cl/pH sensor expression in the brain of transgenic mice. *Neuroscience* 439: 181–194.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.07.010>
17. *Bregestovski P, Arosio D* (2011) Green Fluorescent Protein-Based Chloride Ion Sensors for In Vivo Imaging. In: Jung G (eds) *Fluorescent Proteins II*. Springer Series on Fluorescence 12 Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/4243_2011_27
18. *Edelstein AD, Tsuchida MA, Amodaj N, Pinkard H, Vale RD* (2014) Advanced methods of microscope control using μ Manager software. *J Biol Methods* 1(2): 1–10.
<https://doi.org/10.14440/jbm.2014.36>
19. *Ponomareva D, Petukhova E, Bregestovski P* (2021) Simultaneous Monitoring of pH and Chloride (Cl⁻) in Brain Slices of Transgenic Mice. *Int J Mol Sci* 22(24): 13601.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413601>
20. *Markova O, Mukhtarov M, Real E, Jacob Y, Bregestovski P* (2008) Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity. *J Neurosci Methods* 170(1): 67–76.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.12.016>
21. *Arosio D, Ricci F, Marchetti L, Gualdani R, Albertazzi L, Beltram F* (2010) Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. *Nature Methods* 7(7): 516–518.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1471>
22. *Mukhtarov M, Markova O, Real E, Jacob Y, Buldakova S and Bregestovski P* (2008) Monitoring of chloride and activity of glycine receptor channels using genetically encoded fluorescent sensors. *Philosoph Transact Royal Soc A: Mathemat Physical Engineer Sci* 366(1880): 3445–3462.
<https://doi.org/10.1098/rsta.2008.0133>
23. *Waseem T, Mukhtarov M, Buldakova S, Medina I, Bregestovski P* (2010) Genetically encoded Cl-Sensor as a tool for monitoring of Cl-dependent processes in small neuronal compartments. *J Neurosci Methods* 193(1): 14–23.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.08.002>
24. *Caroni P* (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 71(1): 3–9.
[https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00121-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00121-5)
25. *Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng G* (2007) In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* 54(2): 205–218.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.03.005>
26. *Berglund K, Schleich W, Wang H, Feng G, Hall WC, Kuner T, Augustine GJ* (2008) Imaging synaptic inhibition throughout the brain via genetically targeted Clomeleon. *Brain Cell Biol* 36: 101–118.
<https://doi.org/10.1007/s11068-008-9031-x>
27. *Bradley A* (2002) Mining the mouse genome. *Nature* 420: 512–514.
<https://doi.org/10.1038/420512a>
28. *Zhang Z, Carriero N, Gerstein M* (2004) Comparative analysis of processed pseudogenes in the mouse and human genomes. *Trends Genetics* 20(2): 62–67.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.12.005>
29. *Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR* (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28(1): 41–51.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00084-2)
30. *Bryan KJ, Lee HG, Perry G, Smith MA, Casadesus G* (2011) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: behavioral testing and considerations. *Front Neurosci* 2(1).
31. *Yang XW, Gong S* (2005) An overview on the generation of BAC transgenic mice for neuroscience research. *Current Protocols Neurosci* 31(1): 5–20.
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0520s31>
32. *Navabpour S, Kwapis JL, Jarome TJ* (2020) A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. *Neurosci Biobehav Rev* 108: 732–748.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.013>
33. *Kamioka Y, Sumiyama K, Mizuno R, Sakai Y, Hirata E, Kiyokawa E, Matsuda M* (2012) Live imaging of protein kinase activities in transgenic mice expressing FRET biosensors. *Cell Struct Funct* 37(1): 65–73.
<https://doi.org/10.1247/csf.11045>

34. *Halls ML, Canals M* (2018) Genetically encoded FRET biosensors to illuminate compartmentalised GPCR signalling. *Trends Pharmacol Sci* 39(2): 148–157.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.09.005>
35. *Gong B, Kielar C, Morton AJ* (2012) Temporal separation of aggregation and ubiquitination during early inclusion formation in transgenic mice carrying the Huntington's disease mutation. *PLoS One* 7(7): e41450.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041450>
36. *Vázquez-Chona FR, Clark AM, Levine EM* (2009) Rlbp1 promoter drives robust Müller glial GFP expression in transgenic mice. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 50(8): 3996–4003.
<https://doi.org/10.1167/iovs.08-3189>
37. *Bridge KE, Berg N, Adalbert R, Babetto E, Dias T, Spillantini MG, Ribchester RR, Coleman MP* (2009) Late onset distal axonal swelling in YFP-H transgenic mice. *Neurobiol Aging* 30(2): 309–321.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.002>
38. *Taylor-Clark TE, Wu KY, Thompson JA, Yang K, Bahia PK, Ajmo JM* (2015) Thy1. 2 YFP-16 transgenic mouse labels a subset of large-diameter sensory neurons that lack TRPV1 expression. *PLoS One* 10(3): e0119538.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119538>
39. *Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE* (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68(5): 869–877.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90030-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90030-G)
40. *Suckow MA, Danneman P, Brayton C* (2001) The laboratory mouse. CRC Press Inc 1(1).
<https://doi.org/10.1201/9780849376276>
41. *Yakubova A, Davidyuk Y, Tohka J, Khayrutdinova O, Kudryavtsev I, Nurkhametova D, Kamshilin A, Giniyatullin R, Rizvanov A* (2021) Searching for Predictors of Migraine Chronification: a Pilot Study of 1911A > G Polymorphism of TRPV1 Gene in Episodic Versus Chronic Migraine. *J Mol Neurosci* 71: 618–624.
<https://doi.org/10.1007/s12031-020-01683-9>
42. *Casola S* (2010). Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus. In: *MicroRNAs and the Immune System*. Humana Press. Totowa. 145–163.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-811-9_10

A Test System for Monitoring the Genetic Purity of Transgenic Mice Lines Expressing Chloride and Hydrogen Biosensors

Y. N. Davidyuk^{a, *}, A. Kh. Yusupova^b, E. O. Petukhova^{a, b}, and P. D. Bregestovski^{b, c, **}

^a*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia*

^b*Institute of Neurosciences, Kazan State Medical University, Kazan, Russia*

^c*Institut de Neurosciences des Systemes, Aix-Marseille University, INSERM, INS, Marseille, France*

**e-mail: davi.djuk@mail.ru*

***e-mail: pbreges@gmail.com*

Models with genetic manipulation of animals have been widely used in various fields of medicine and biological research. Thousands of genetically modified transgenic mouse models have been created in recent decades and their production is accelerating. Therefore, an urgent problem is the maintenance and control of the genetic purity of the transgenic mice lines. Our research uses lines of transgenic mice expressing genetically encoded probes in neurons for noninvasive monitoring of chloride ions (“Cl-Sensor”) and simultaneous registration of chloride and hydrogen (“ClpHensor”). To maintain the purity of these lines, we have developed a test system for genotyping transgenic mice. The approach is characterized by high reliability of the results and can be used for further control of the genetic purity of these lines, as well as control of animal lines with slightly different parts of amino acid sequences.

Keywords: transgenic lines, chloride and hydrogen sensors, genetic control, PCR