

## СОДЕРЖАНИЕ

---

### От редактора специального выпуска

Центральная регуляция эндокринных функций в норме и при патологии	1071
---	------

---

### Обзорные и проблемные статьи

Нейроэндокринный контроль гиперглутаматергических состояний при патологиях мозга: влияние глюкокортикоидов <i>Н. В. Гуляева</i>	1077
Рецептор тиреотропного гормона: роль в развитии тиреоидной патологии и перспективная мишень для ее коррекции <i>Е. А. Фокина, А. О. Шпаков</i>	1094

---

### Экспериментальные статьи

Дифференциальное влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов крыс перед спариванием на активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы половозрелых потомков <i>Н. Э. Ордян, С. Г. Пивина, Г. И. Холова, В. К. Акулова, В. В. Ракицкая</i>	1114
Экспрессия mTOR в нейронах туберальной области гипоталамуса крыс при старении <i>П. А. Анфимова, К. Ю. Моисеев, В. В. Порсева, Л. Г. Панкрашева, П. М. Маслюков</i>	1125
Ранние изменения функционального состояния артерий и сосудов микроциркуляторного русла при моделировании метаболического синдрома <i>И. А. Царева, Г. Т. Иванова, Г. И. Лобов</i>	1134
Участие iNOS в формировании тонуса пиальных артерий при метаболических нарушениях и стрептозотоциновом диабете у крыс, содержащихся на высокожировой диете <i>И. Б. Соколова</i>	1148
Дисбаланс гормонов, вовлеченных в регуляцию энергетического баланса у больных ожирением – изучение вклада в нарушение пищевого поведения и метаболических параметров <i>А. Ю. Бабенко, Г. А. Матвеев</i>	1159
Разработка подходов для снижения эффективной дозы гонадотропина при лечении андрогенной недостаточности у самцов крыс с сахарным диабетом 1-го типа <i>А. А. Бахтюков, И. Ю. Морина, К. В. Деркач, И. В. Романова, В. Н. Сорокоумов, А. О. Шпаков</i>	1175
Механизм влияния тестостерона на белок-транспортёр Р-гликопротеин <i>А. А. Слепнев, А. В. Шулькин, Ю. В. Абаленихина, Н. М. Попова, И. В. Черных, Е. Н. Якушева</i>	1188

Роль метаболического воспаления в развитии секреторного фенотипа клеток и когнитивной дисфункции у мышей при старении

*Е. Д. Хилажева, О. С. Белозор, Ю. А. Панина, Я. В. Горина,  
А. И. Мосягина, А. В. Васильев, Н. А. Малиновская, Ю. К. Комлева*

1200

Экспериментальное исследование нейропротективного эффекта ингибиторов натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа

*А. В. Симаненкова, О. С. Фукс, Н. В. Тимкина, Т. Л. Каронова,  
Д. Л. Цыба, О. В. Кирик, Д. Э. Коржевский, Т. Д. Власов*

1222

---

---

# CONTENTS

---

## Special Issue Editor's Note

Endocrine Functions Central Regulation in Normal and Pathological Conditions	1071
--	------

---

## Reviews

Neuroendocrine Control of Hyperglutamatergic States in Brain Pathologies: The Effects of Glucocorticoids <i>N. V. Gulyaeva</i>	1077
Thyroid-Stimulating Hormone Receptor: Role in the Development of Thyroid Pathology and a Promising Target for Its Correction <i>E. F. Fokina and A. O. Shpakov</i>	1094

---

## Experimental Articles

Differential Effect of Male Rat's PTSD-Like or Depression-Like Status before Mating on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis of Adult Offspring <i>N. E. Ordyan, S. G. Pivina, G. I. Kholova, V. K. Akulova, and V. V. Rakitskaya</i>	1114
mTOR Expression in Neurons of the Tuberal Region of the Rat Hypothalamus during Aging <i>P. A. Anfimova, K. Yu. Moiseev, V. V. Porseva, L. G. Pankrasheva, and P. M. Masliukov</i>	1125
Early Changes in the Functional State of the Arteries and Vessels of the Microcirculatory Bed in Modeling the Metabolic Syndrome <i>I. A. Tsareva, G. T. Ivanova, and G. I. Lobov</i>	1134
Participation of iNOS in the Formation of Pial Arteries Tone in Metabolic Disorders and Streptosotocin Diabetes in Rats Kept on a High-Fat Diet <i>I. B. Sokolova</i>	1148
Imbalance in the Response of Hormones Involved in the Regulation of Energy Balance in Obesity Patients – Study of Contribution to Eating Disorders and Metabolic Parameters <i>A. Yu. Babenko, and G. A. Matveev</i>	1159
Development of Approaches to Reduce the Effective Dose of Gonadotropin in the Treatment of Androgen Insufficiency in Male Rats with Type 1 Diabetes Mellitus <i>A. A. Bakhtyukov, I. Yu. Morina, K. V. Derkach, I. V. Romanova, V. N. Sorokoumov, and A. O. Shpakov</i>	1175
The Mechanism of the Influence of Testosterone on the Transport Protein P-Glycoprotein <i>A. A. Slepnev, A. V. Shchulkin, Yu. V. Abalenikhina, N. M. Popova, I. V. Chernykh, and E. N. Yakusheva</i>	1188
The Role of Metaflammation in the Development of Senescence-Associated Secretory Phenotype and Cognitive Dysfunction in Aged Mice <i>E. D. Khilazheva, O. S. Belozor, Yu. A. Panina, Ya. V. Gorina, A. I. Mosyagina, A. V. Vasiliev, N. A. Malinovskaya, and Yu. K. Komleva</i>	1200
Experimental Study of Sodium–Glucose Cotransporter Type 2 Inhibitors Neuroprotective Effect <i>A. V. Simanenkova, O. S. Fuks, N. V. Timkina, T. L. Karonova, D. L. Tsyba, O. V. Kirik, D. E. Korzhevskii, and T. D. Vlasov</i>	1222

---

---



---

---

ОТ РЕДАКТОРА  
СПЕЦИАЛЬНОГО ВЫПУСКА

---

---

ЦЕНТРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭНДОКРИННЫХ ФУНКЦИЙ  
В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

DOI: 10.31857/S0869813922090138

Специальный выпуск Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова посвящен проблеме центральной регуляции функций эндокринной системы как в норме, так и в условиях патологии. В настоящее время эта проблема находится в центре внимания нейрофизиологов, нейрохимиков, нейроэндокринологов, а также практикующих врачей, работающих в области эндокринологии, неврологии, кардиологии, диабетологии, репродуктологии. Актуальность проблемы изучения центральных механизмов регуляции эндокринных функций обусловлена в первую очередь тем, что в последние годы существенно расширился спектр гормонов, ростовых факторов и эффекторных молекул, вовлеченных в эти механизмы, а также усложнились представления о прямых и обратных взаимосвязях между центральными и периферическими звеньями нейроэндокринной системы. Все это можно проиллюстрировать на примере гипоталамо-гипофизарно-гонадной (ГГГ) оси, которая контролирует стероидогенный статус, репродуктивный потенциал и половое поведение. ГГГ ось также вовлечена в регуляцию множества физиологических процессов, которые непосредственно не связаны с функционированием репродуктивной системы, но при этом являются мишенями для основных регуляторов ГГГ оси – гипоталамического фактора гонадолиберина (GnRH), гонадотропинов и половых стероидов.

Длительное время считали, что синтез и секреция гонадотропоцитами аденогипофиза лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов зависит исключительно от выброса гипоталамическими нейронами GnRH, релизинг-фактора обоих гонадотропинов. Однако в последние годы появились данные о том, что множество других регуляторных молекул способны влиять на продукцию гонадотропинов и профиль их секреции, причем как путем контроля выброса GnRH гипоталамическими нейронами, так и в результате непосредственного воздействия на секреторную активность гонадотропоцитов. Ключевую роль в положительной регуляции синтеза и секреции GnRH отводят полипептидному гормону кисспептину, который через специфичные к нему рецепторы, локализованные на поверхности GnRH-экспрессирующих нейронов, стимулирует экспрессию гена, кодирующего GnRH, и усиливает процессинг молекулы про-GnRH, обеспечивая накопление и дальнейшую секрецию “зрелого” GnRH [1]. В свою очередь, продуцируемый нейронами паравентрикулярного ядра гипоталамуса гонадотропин-ингибирующий гормон после связывания со специфичными к нему рецепторами GPR147, расположенными на поверхности экспрессирующих GnRH нейронов, подавляет синтез GnRH, а после связывания с теми же рецепторами на поверхности гонадотропоцитов ингибирует продукцию ими  $\beta$ -субъединиц ЛГ и ФСГ [2]. Секретируемые репродуктивными тканями димерные полипептиды активины и ингибины также влияют на секреторную активность гипоталамических GnRH-нейронов и гонадотропоцитов соответственно, стимулируя (активины) или подавляя (ингибины) выброс GnRH и обоих гонадотропинов. Экспрессируемый в гипофизе и гонадах фоллистатин специфичен в отношении синтеза и секреции ФСГ, подавляя

продукцию этого гонадотропина как на гипоталамическом, так и на гипофизарном уровнях. Регуляторами продукции GnRH являются продуцируемые гипоталамическими нейронами факторы пищевого поведения. Среди них орексигенные факторы – нейропептид Y и агути-подобный пептид, которые подавляют синтез и секрецию GnRH, и пептиды меланокортинового семейства, генерируемые из про-опиомеланокортина, которые, напротив, усиливают продукцию GnRH [3].

Важнейшую роль в контроле продукции GnRH и гонадотропинов играют адипокины – гормоноподобные вещества, продуцируемые адипоцитами [1, 4, 5]. Адипокин лептин функционирует как позитивный регулятор, стимулируя секрецию GnRH, причем его эффект реализуется с помощью трех различных механизмов – через стимуляцию нейронов, продуцирующих про-опиомеланокортин и кисспептин, усиливающие секрецию GnRH, и через ингибирование продукции нейропептида Y и агути-подобного пептида, негативных регуляторов секреции GnRH [4, 6]. Противоположный лептину эффект на продукцию GnRH оказывает адипонектин, который по многим свойствам является функциональным антагонистом лептина. Важно отметить, что лептин и адипонектин могут экспрессироваться в гонадотропоцитах и, функционируя как ауто- и паракринные факторы, стимулируют (лептин) и ингибируют (адипонектин) синтез и секрецию гонадотропинов, в первую очередь ЛГ, но уже на гипофизарном уровне. Наряду с лептином и адипонектином, разнонаправленные влияния на гипоталамические GnRH-экспрессирующие нейроны и на ГГГ ось в целом могут оказывать и другие адипокины, в том числе резистин, грелин, апелин, оментин, висфатин [4, 5]. Таким образом реализуется тесная взаимосвязь пищевого поведения и обеспеченности организма энергетическими ресурсами с половым поведением и репродуктивным потенциалом.

В условиях эндокринной патологии, при голодании и старении адипокиновая сигнализация в гипоталамусе нарушается, и это неизбежно ведет к нарушениям центральной регуляции ГГГ оси. Так, при ожирении, метаболическом синдроме и сахарном диабете 2-го типа развивается выраженная резистентность тканей к лептину и его синергисту инсулину, нарушается транспорт лептина в мозг через гематоэнцефалический барьер, повышается активность негативных регуляторов лептинового сигналинга, что, в конечном итоге, приводит к ослаблению лептиновой сигнализации в гипоталамусе и подавлению секреции GnRH и гонадотропинов [4]. Следствием этого является ослабление тестикулярного и овариального стероидогенеза, нарушения сперматогенеза и фолликулогенеза и, как результат, снижение, иногда до критического уровня, репродуктивного потенциала. При голодании уровень лептина резко снижается, что приводит к его системному дефициту и ослабляет лептиновый сигналинг в ЦНС. При этом в гипоталамусе активируются сигнальные пути, запускаемые орексигенными факторами, негативными регуляторами ГГГ оси. Все это приводит к тому, что в условиях недостатка пищевых ресурсов репродуктивные функции транзиторно ослабевают, а при длительном истощении у мужчин и женщин может развиваться бесплодие [7]. В этой связи необходимо отметить, что как сильно выраженное ожирение, так и анорексия в значительной степени снижают эффективность вспомогательных репродуктивных технологий (экстракорпорального оплодотворения), блокируя центральную регуляцию ГГГ оси [3, 4]. Все вышесказанное открывает широкие перспективы для разработки на основе адипокинов новых подходов для регуляции ГГГ оси и нормализации репродуктивных функций, ослабленных при метаболических расстройствах.

В последние годы появились неоспоримые свидетельства того, что основные компоненты гипоталамо-гипофизарной системы тесно взаимодействуют между собой. Это лежит в основе взаимодействия между ГГГ, гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной (ГГТ) и гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной (ГГА) осями. При этом регуляторы и модуляторы ГГГ оси способны влиять на активность ГГТ и

ГГА осей, что доказано как для факторов пищевого поведения, так и для адипокинов и инкретинов. В свою очередь эффекторные гормоны этих осей – половые стероиды, тиреоидные гормоны и кортикостероиды по механизму обратной связи контролируют активность вышележащих, в том числе гипоталамических, звеньев всех трех осей. Так, например, при нарушении режима сна или в условиях длительной бессонницы вырабатываемые в избыточных количествах кортикостероиды негативно влияют не только на функции ГГА оси, но и на активность ГГГ и ГГТ осей [8]. Все это указывает на существование сложной интегративной системы нейроэндокринной регуляции, механизмы функционирования которой еще далеки от расшифровки, а молекулярные посредники до конца не определены.

Наряду с концептуальными изменениями во взглядах на центральную регуляцию эндокринных функций, за последние годы изменились и многие, казалось бы, незыблемые, представления о периферических звеньях гипоталамо-гипофизарной системы. Достаточно упомянуть современные достижения в области изучения происхождения, структурно-функциональной организации и молекулярных механизмов действия гонадотропинов. Среди них можно выделить следующие: (1) открытие феномена дифференцированного N-гликозилирования молекул ЛГ и ФСГ, определяющего их активность и сигнальные свойства, а также опосредующего изменение функциональной активности гонадотропинов в онтогенезе и при различных эндокринных и метаболических заболеваниях; (2) обнаружение большого числа изоформ хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), структурного и функционального гомолога ЛГ, а также открытие гипофизарной формы ХГЧ, которая продуцируется на протяжении всего постпубертатного периода у женщин и мужчин; (3) открытие сигнальных механизмов действия гонадотропинов по независимым от G-белков сигнальным путям – через  $\beta$ -аррестины, а в случае гипергликозилированной формы ХГЧ – через рецепторы трансформирующего фактора- $\beta$ ; (4) обнаружение аллостерической регуляции рецепторов ЛГ и ФСГ и создание низкомолекулярных регуляторов и модуляторов аллостерического сайта этих рецепторов. Открытые для гонадотропинов феномены дифференцированного N-гликозилирования, G-белок-независимых механизмов действия и аллостерической регуляции в полной мере применимы для тиреотропного гормона (ТТГ), важнейшего регулятора функций щитовидной железы, и его рецептора. При этом определяющую роль здесь играют аутоантитела к рецептору ТТГ, которые способны регулировать и модулировать его функциональную активность, действуя по аллостерическому механизму, и являются одной из первопричин аутоиммунных заболеваний и рака щитовидной железы.

Статьи, вошедшие в Специальный выпуск, посвящены различным аспектам центральной регуляции эндокринных функций, а также функционированию нижеописанных компонентов гипоталамо-гипофизарной системы.

Экспериментальные работы предваряют два фундаментальных обзора. В обзоре, подготовленном Н.В. Гуляевой, ведущим специалистом в области нейрохимии и нейроэндокринной регуляции, анализируются и обобщаются современные представления о роли глукотортикоидов в регуляции активности глутаматергической системы мозга [9]. Автор, базируясь в том числе на собственных результатах, детально анализирует последствия нарушений такой регуляции, вызванные дисфункциями в ГГА оси, результатом чего являются гиперглутаматергические состояния, когнитивные и эмоциональные расстройства, различные по этиопатогенезу нейродегенеративные заболевания, а также широкий спектр эндокринных патологий. Второй обзор посвящен структурно-функциональной организации рецептора ТТГ, сигнальным каскадам, которые запускаются при активации этого рецептора эндогенными агонистами, а также фармакологическим подходам, направленным на позитивную и негативную регуляцию его активности [10]. Отдельно рассматри-

ваются основы аллостерической регуляции активности рецептора ТТГ, а также описываются разработанные в последние годы его аллостерические регуляторы с активностью полных и инверсионных агонистов и нейтральных антагонистов, которые разнонаправленно влияют на продукцию тиреоидных гормонов щитовидной железой.

Экспериментальное исследование Н.Э. Ордян и соавт. посвящено сравнительному изучению эффектов посттравматического стрессового расстройства (парадигма “стресс-рестресс”) и депрессивно-подобного состояния (парадигма “выученная беспомощность”) у самцов крыс перед спариванием на активность ГГА системы у их половозрелых потомков [11]. В результате было установлено, что оба стрессовых состояния у самцов крыс в период сперматогенеза оказывают выраженное влияние на функциональное состояние ГА системы и на экспрессию глюкокортикоидных рецепторов в мозге у их потомков, причем это влияние зависит от характера стрессового воздействия. В работе Бахтюкова А.А. и соавт. изучена способность ТПОЗ, нового аллостерического агониста рецептора ЛГ, усиливать стимулирующие эффекты сравнительно низких доз ХГЧ на тестикулярный стероидогенез у самцов крыс с андрогенной недостаточностью, вызванной сахарным диабетом 1-го типа [12]. Показана способность ТПОЗ повышать эффективность стероидогенного воздействия ХГЧ, что позволяет разработать оптимальные схемы для фармакотерапии андрогенного дефицита при диабете и, наряду с этим, предотвратить серьезные побочные эффекты, отмечаемые при использовании высоких доз ХГЧ. Ярославские ученые обнаружили значимые изменения экспрессии киназы mTOR, одной из важнейших внутриклеточных мишеней инсулина и лептина, в нейронах туберальных ядер гипоталамуса у стареющих крыс. Эти данные указывают на компенсаторные изменения активности эффекторных звеньев инсулинового и лептинового сигналинга в процессе старения, которые могут быть одной из причин возрастного ослабления нейроэндокринной регуляции [13]. Ученые из Красноярска исследовали инсулиновую сигнализацию и воспалительные процессы в головном мозге стареющих мышей и продемонстрировали усиление экспрессии и фосфорилирования факторов воспаления без значимого снижения чувствительности нейронов к инсулину, что указывает на перспективность противовоспалительной терапии для сохранения нормального функционирования головного мозга при старении и предотвращения возрастных когнитивных и нейроэндокринных дисфункций [14]. Рязанские ученые в опытах *in vitro* и *in vivo* показали, что тестостерон вызывает снижение количества мембранного белка-транспортера Pgp, который играет важную роль в защите опухолевых клеток от цитостатиков и определяет фармакокинетику ряда лекарственных препаратов. Выявленный эффект тестостерона в значительной степени определяется его способностью связываться с андростановым рецептором, который структурно близок андрогеновому рецептору, и ингибировать его конститутивную активность [15]. В работе И.Б. Соколовой были выявлены нарушения в опосредованной ацетилхолином дилаторной реакции пиальных артерий сенсомоторной коры головного мозга у крыс Sprague Dawley с сахарным диабетом 2-го типа, что может быть одной из причин нарушения газообмена между кровью и тканью мозга и приводить к гипоксии и нейродегенеративным изменениям в различных отделах мозга [16]. Нарушения периферической микроциркуляции были выявлены и у крыс с метаболическим синдромом, индуцированным фруктозной нагрузкой, причем одной из причин этого было снижение продукции NO и, как следствие, ингибирование активности растворимой гуанилатциклазы. Ослабление системы NO-гуанилатциклаза-цГМФ частично компенсировалось повышением продукции эндотелиального гиперполяризующего фактора [17]. Поскольку адипокины играют важную роль в функционировании гипоталамо-гипофизарной системы, то исследование их ответа на пищевые стимулы, в том числе при метаболиче-

ских расстройств, имеет большое значение для изучения ассоциированных с дисбалансом адипокинов нарушений в ГГГ, ГГТ и ГА осях. В исследовании А.Ю. Бабенко и Г.А. Матвеева показано, что нарушение ответа лептина и грелина отмечается в основном у пациентов с ожирением, но в значительной степени выраженный дисбаланс адипокинов выявлен только при метаболически нездоровом фенотипе ожирения, для которого характерна дислипидемия [18]. Одним из кандидатов для предотвращения тяжелых последствий ишемического инсульта могут стать ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа (НГЛТ-2), ранее продемонстрировавшие свою эффективность при сердечно-сосудистых расстройствах. В.А. Симаненкова и соавт. показали, что высокоселективный ингибитор НГЛТ-2 эмпаглифлозин и низкоселективный ингибитор НГЛТ-2 канаглифлозин снижают объем поврежденной ткани мозга при их применении в течение недели до индукции острой ишемии головного мозга у крыс, что указывает на их выраженный нейропротекторный и антигипоксический эффект [19].

Редакция журнала полагает, что представленные в Специальном выпуске исследования и полученные новые, перспективные данные станут мощным стимулом для дальнейших работ по изучению центральной регуляции эндокринных функций и тесно связанных с ними физиологических процессов. В дальнейшем это, безусловно, поможет разработать и внедрить новые диагностические и терапевтические подходы для лечения эндокринных и неврологических заболеваний, а также метаболических и репродуктивных дисфункций.

А.О. Шпаков  
доктор биологических наук, профессор,  
заместитель директора Института  
эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
г. Санкт-Петербург

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ghaderpour S, Ghiasi R, Heydari H, Keyhanmanesh R* (2021) The relation between obesity, kisspeptin, leptin, and male fertility. *Horm Mol Biol Clin Investig* 20. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2021-0058>
2. *Bédécarrats GY, Hanlon C, Tsutsui K* (2022) Gonadotropin Inhibitory Hormone and Its Receptor: Potential Key to the Integration and Coordination of Metabolic Status and Reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12: 781543. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.781543>
3. *Шпаков АО* (2018) Гонадотропины – от теории к клинической практике. ПОЛИТЕХ-Пресс СПб. [*Shpakov AO* (2018) Gonadotropiny – ot teorii k klinicheskoy praktike. POLITEKH-pess Sankt-Peterburg. (In Russ)].
4. *Шпаков АО* (2018) Адипокины и их роль в регуляции репродуктивных функций. ПОЛИТЕХ-Пресс СПб. [*Shpakov AO* (2018) Adipokiny i ih rol' v regulyacii reproduktivnyh funkcij. POLITEKH-pess Sankt-Peterburg. (In Russ)].
5. *Chen P, Jia R, Liu Y, Cao M, Zhou L, Zhao Z* (2022) Progress of Adipokines in the Female Reproductive System: A Focus on Polycystic Ovary Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 881684. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.881684>
6. *Guzmán A, Hernández-Coronado CG, Rosales-Torres AM, Hernández-Medrano JH* (2019) Leptin regulates neuropeptides associated with food intake and GnRH secretion. *Ann Endocrinol (Paris)* 80(1): 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.07.012>
7. *Boutari C, Pappas PD, Mintzioti G, Nigdelis MP, Athanasiadis L, Goulis DG, Mantzoros CS* (2020) The effect of underweight on female and male reproduction. *Metabolism* 107: 154229. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154229>
8. *Lateef OM, Akintubosun MO* (2020) Sleep and Reproductive Health. *J Circad Rhythms* 18: 1. <https://doi.org/10.5334/jcr.190>

9. *Гуляева НВ* (2022) Гиперглутаматергические состояния при патологиях мозга: роль глюкокортикоидов. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1077–1093.
10. *Фокина ЕА, Шпаков АО* (2022) Рецептор тиреотропного гормона: роль в развитии тиреоидной патологии и перспективная мишень для ее коррекции. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1094–1113.
11. *Ордян НЭ, Пивина СГ, Холова ГИ, Акулова ВК, Ракицкая ВВ* (2022) Дифференциальное влияние ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния самцов крыс перед спариванием на активность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы половозрелых потомков. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1114–1124.
12. *Бахтюков АА, Морина ИЮ, Деркач КВ, Романова ИВ, Сорокоунов ВН, Шпаков АО* (2022) Разработка подходов для снижения эффективной дозы гонадотропина при лечении андрогенной недостаточности у самцов крыс с сахарным диабетом 1-го типа. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1175–1187.
13. *Анфимова ПА, Моисеев КЮ, Порсева ВВ, Панкрашева ЛГ, Маслюков ПМ* (2022) Экспрессия mTOR в нейронах туберальной области гипоталамуса крыс при старении. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1125–1133.
14. *Хилажеева ЕД, Белозор ОС, Панина ЮА, Горина ЯВ, Мосягина АИ, Васильев АВ, Малиновская НА, Комлева ЮК* (2022) Роль метаболического воспаления в развитии секреторного фенотипа клеток и когнитивной дисфункции у мышей при старении. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1200–1221.
15. *Слепнев АА, Шулькин АВ, Абаленихина ЮВ, Попова НМ, Черных ИВ, Якушева ЕН* (2022) Механизм влияния тестостерона на белок-транспортёр Р-гликопротеин. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1188–1199.
16. *Соколова ИБ* (2022) Участие iNOS в формировании тонуса пиальных артерий при метаболических нарушениях и стрептозотоциновом диабете у крыс, содержащихся на высокожировой диете. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1148–1158.
17. *Царева ИА, Иванова ГТ, Лобов ГИ* (2022) Ранние изменения функционального состояния артерий и сосудов микроциркуляторного русла при моделировании метаболического синдрома. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1134–1147.
18. *Бабенко АЮ, Матвеев ГА* (2022) Дисбаланс ответа гормонов, вовлеченных в регуляцию энергетического баланса у больных ожирением – изучение вклада в нарушение пищевого поведения и метаболических параметров. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1159–1174.
19. *Симаненкова АВ, Фукс ОС, Тимкина НВ, Каронова ТЛ, Цыба ДЛ, Кирик ОВ, Коржевский ДЭ, Власов ТД* (2022) Экспериментальное исследование нейропротекторного эффекта ингибиторов натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(9): 1222–1238.

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

НЕЙРОЭНДОКРИННЫЙ КОНТРОЛЬ ГИПЕРГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ  
СОСТОЯНИЙ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ МОЗГА:  
ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

© 2022 г. Н. В. Гуляева<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева, Москва, Россия

\*E-mail: nata\_gul@ihna.ru

Поступила в редакцию 09.08.2022 г.

После доработки 12.08.2022 г.

Принята к публикации 15.08.2022 г.

Нейроэндокринный контроль, опосредованный глюкокортикоидами, важен для поддержания нормального функционирования мозга и баланса между системами возбуждения и торможения. Глюкокортикоиды регулируют состояние глутаматергической системы мозга как непосредственно, через рецепторы на глутаматергических синапсах, так и опосредованными путями. Нарушение функционирования гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и ее неспособность оптимально регулировать глутаматергическую синаптическую пластичность приводит к развитию нейропсихических заболеваний, в патогенезе которых ключевую роль могут играть гиперглутаматергические состояния. Нарушение глюкокортикоидного контроля глутаматергических процессов лежит в основе когнитивных и эмоциональных расстройств, эпилепсии и ряда других церебральных патологий, являясь общим базовым механизмом развития многих болезней мозга и их коморбидностей. В связи с этим исследование механизмов взаимодействия гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и глутаматергической системы мозга имеет приоритетное трансляционное значение.

*Ключевые слова:* гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, глюкокортикоиды, глутаматергический синапс, гиперглутаматергические состояния, гиппокамп, болезни мозга, нейродегенерация

DOI: 10.31857/S0869813922090102

## ВВЕДЕНИЕ

Реакция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) является ключевым событием нейроэндокринного ответа на любое значимое для организма событие (стресс). Основными компонентами этой каскадной реакции являются секреция гипоталамического кортикотропин-рилизинг гормона, стимулирующего высвобождение гипофизарного адренотропного гормона (АКТГ), который в свою очередь вызывает высвобождение глюкокортикоидных гормонов (ГК) из коры надпочечников (кортикостерона у большинства грызунов; кортизола у чело-

---

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ: АКТГ – адренотропный гормон; AMPA-рецептор – рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты; BDNF – мозговой нейротрофический фактор; NMDA-рецептор – N-метил-D-аспаратный рецептор; БА – болезнь Альцгеймера; ГГНО – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось; ГК – глюкокортикоидный гормон (глюкокортикоиды); ГР – глюкокортикоидный рецептор; МР – минералокортикоидный рецептор.

века) [1]. Поступившие в кровь ГК, наряду с периферическим, реализуют центральное действие, взаимодействуя со специфическими рецепторами в мозге. Многообразный спектр эффектов ГК на метаболизм тканей нервной системы был отмечен достаточно давно и не вызывал удивления исследователей, учитывая большое биохимическое и морфологическое разнообразие различных типов клеток, присутствующих в центральной и периферической нервной системах [2]. Обширные исследования, проведенные в течение последних десятилетий, предоставили убедительные доказательства того, что ГК обладают способностью регулировать развитие, выживание и гибель нейронов. При этом стали очевидными парадоксальные особенности ГК, которые могут быть критически вовлечены как в нейродегенеративные, так и в нейропротекторные процессы [3].

### ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ – КЛЮЧЕВЫЕ НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ПЛАСТИЧНОСТИ МОЗГА

Нормальная активность ГНО, обеспечивающая ритмичное высвобождение ГК, необходима для гомеостаза организма и преодоления неблагоприятных условий среды. Действуя через специфические внутриклеточные рецепторы в головном мозге и на периферии, ГК регулируют поведение, а также метаболическую, сердечно-сосудистую, иммунную и нейроэндокринную активности. В дополнение к метаболическим эффектам, ведущим к выработке необходимого количества энергии, ГК, помимо иммуносупрессивного действия, может стимулировать иммунную систему при циркадианном повышении их уровня, обеспечивая острые защитные реакции. Отрицательная обратная связь, реализуемая ГК, включает множество механизмов, приводящих к ограничению активации ГНО и предотвращению вредных последствий чрезмерной выработки ГК. Циркадианное и вызванное умеренным острым стрессом повышение уровня ГК необходимо для выживания нейронов, облегчения глутаматергической нейротрансмиссии и образования возбуждающих συναпсов, а также индукции ранних генов [4].

В нервной системе ГК взаимодействуют с клеточными рецепторами, глюкокортикоидными (ГР) и минералокортикоидными (МР), которые существуют в цитоплазматической/ядерной и мембранной формах. Трансдукция сигнала через мембранные рецепторы реализует быстрые негеномные эффекты ГК, в частности на возбудимость и активность нейронов в гиппокампе, гипоталамусе, амигдале и префронтальной коре, и таким образом влияет на когнитивные функции, адаптивное поведение и нейроэндокринную систему. Цитоплазматические/ядерные рецепторы участвуют в более медленных и продолжительных изменениях, связанных с экспрессией генов. Несмотря на то, что рецепторы ГК экспрессированы в каждой клетке нервной системы, их состав и уровень экспрессии варьируется, в результате чего различные типы клеток по-разному реагируют на активацию этих рецепторов. ГК индуцируют структурную пластичность в нейронах, шванновских клетках, микроглии, олигодендроцитах и астроцитах, а также влияют на нейротрансмиссию, в частности изменяя высвобождение и обратный захват глутамата.

Для осуществления контроля функции мозга посредством ГНО принципиально важна дифференциальная локализация различных рецепторов ГК в мозге. ГР экспрессируются в большинстве структур и регионов мозга, а МР экспрессированы в основном в тех регионах мозга, которые имеют решающее значение для формирования памяти и эмоций, в первую очередь в структурах лимбической системы, гиппокампе, миндалине и префронтальной коре [5]. МР обладают высокой аффинностью и поэтому связаны с ГК при низком уровне гормонов, а сродство ГР к ГК на порядок ниже, поэтому активация этих рецепторов происходит при высоком уровне ГК. Быстрые эффекты ГК реализуются преимущественно через сигнал,

проводимый мембранными МР, а медленные структурно-функциональные перестройки клеток мозга регулируются в основном геномными эффектами через ГР. Таким образом, благодаря трансдукция сигнала ГК через МР и ГР клетки мозга способны адекватно отвечать на значимые события и реализовать быстрые и продолжительные пластические изменения. Это дает возможность всем клеткам мозга, и в первую очередь нейронам, адекватно отвечать на действие разнообразных стрессорных факторов.

Сигнальная трансдукция, осуществляемая через рецепторы ГК, играет ключевую роль в интеграции ответа и взаимодействия ключевых систем (в т.ч. нейромедиаторных, метаболических, нейроиммунной, нейротрофиновой и др.) при поддержке и настройке нейропластичности. В итоге дифференцированная рецепция ГК в разных структурах и клетках мозга контролирует практически все активности нервной системы, включая обучение и память, регулируя их на субклеточном, клеточном и сетевом уровнях [1, 6, 7]. В последние годы расшифрованы многие механизмы влияния ГК на синаптическую функцию и синаптическую пластичность, лежащие в основе когнитивных функций и эмоций [8]. Если представить эффекты ГК максимально упрощенно, можно констатировать, что ГК модулируют кодирование информации в мозге через сигнальные механизмы, опосредованные МР, а консолидацию и процессинг информации через ГР. ГК изменяют динамику активности нейронов, приводя к изменениям, зависящим от контекста, включая как возбуждение, так и торможение, и в норме эти эффекты обеспечивают и поддерживают реакции организма, связанные с решаемой задачей. ГК обеспечивают диверсификацию доступных источников энергии, которые могут использоваться для поддержания активности мозга, однако чрезмерные концентрации ГК ухудшают выработку энергии (АТФ) и окисление в митохондриях. Таким образом, в соответствии с концепцией аллостатической нагрузки и перегрузки, ГК оказывают как адаптивное, так и дезадаптивное действие [9]. В связи с этим дисфункция ГГНО и рецепторов ГК нарушает адекватную реакцию организма на значимые факторы, и это лежит в основе развития неврологических и психических заболеваний.

За последние 30 лет появляется все больше свидетельств того, что ключевыми мишенями ГК в мозге являются лимбические структуры, в первую очередь гиппокамп, структура с максимальной плотностью рецепторов ГК. Считается, что кумулятивное воздействие ГК определяет скорость потери нейронов в стареющем гиппокампе, поэтому стресс может ускорить дегенерацию гиппокампа при старении. Более того, при обстоятельствах, когда воздействие ГК недостаточно для повреждения нейронов, ГК снижают способность нейронов выживать при экстремальных воздействиях, таких как гипоксия–ишемия, судороги или гипогликемия [10]. В связи с тем, что именно гиппокамп является ключевой структурой, опосредующей реализацию обучения и памяти, а также эмоций, и с учетом регуляции ГГНО гиппокампом, вызванное ГК повреждение гиппокампа, в т.ч. его атрофия, может играть важную роль в патогенезе целого ряда нервно-психических расстройств [11, 12].

### ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА МОЗГА: РЕГУЛЯЦИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ

Универсальный межнейронный интерфейс, синапс, является ключевым элементом пластичности мозга. Глутамат – наиболее распространенный нейромедиатор в ЦНС, рецепторы которого присутствуют на более чем 90% нейронов и 40% синапсов [13]. В настоящее время в ЦНС идентифицировано более 20 рецепторов глутамата (ионотропных, представляющим собой ионный канал, и metabotropic, трансдукция сигнала через которые опосредована вторичными посредниками), причем

каждый отдельный рецептор имеет несколько подтипов. Функциональными элементами, обеспечивающими глутаматную нейротрансмиссию, являются пре- и постсинаптические нейроны вместе с глиальными клетками, которые образуют так называемый “трехсторонний синапс” (tripartite synapse) [14]. Трехсторонний синапс функционирует как через метаботропные, так и через ионотропные рецепторы (эти рецепторы и их функции подробно описаны в статье [15]). Глутамат синтезируется из глутамината глутаминатом в пресинаптических нейронах, и затем транспортируется к синаптическим окончаниям. В пресинапсе глутамат накапливается в везикулах везикулярными транспортерами глутамата (VGLUT) 1–3 и высвобождается при деполяризации. При этом передача сигналов осуществляется через ионотропные и метаботропные глутаматные рецепторы, расположенные в разных компартаментах трехстороннего синапса. Передача сигнала прекращается путем захвата глутамата из синаптической щели высокоэффективными транспортерами возбуждающих аминокислот (EAAT), которые преимущественно расположены на астроцитах. В астроците глутаминсинтетаза превращает глутамат в глутамин, который может затем попадать во внеклеточное пространство и пресинапс в процессе, называемом циклом глутамат/глутамин. Глутаматные рецепторы и транспортеры вместе действуют как критические регуляторы глутаматергической системы за счет модуляции силы сигнала и внеклеточных концентраций глутамата. Именно тщательная регуляция внеклеточного глутамата имеет решающее значение для предотвращения постоянной активации рецепторов, которая может привести к эксайтотоксичности и гибели нейронов.

Ионотропные рецепторы, NMDA (N-метил D-аспартат) и AMPA ( $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота) типов локализованы на постсинаптической мембране, функционально зависят друг от друга во время деполяризации мембраны, но взаимодействуют с глутаматом независимо. Высокая плотность NMDA-рецепторов, экспрессируемых на нейронах и астроцитах во всем мозге и особенно в гиппокампе, способствует обучению, памяти и синаптической пластичности [16, 17], но гиперактивация рецепторов приводит к нейродегенерации. Считают, что такая двойственность обусловлена субклеточной локализацией NMDA-рецепторов: их синаптическая активация вызывает кальций-опосредованные благоприятные изменения транскрипции, в то время как экstrasинаптическая активация запускает сигнальные пути, которые снижают устойчивость к стрессу и стимулируют нейродегенерацию [18]. Предполагается, что AMPA-рецепторы играют важную роль в синаптической пластичности, обеспечивая необходимый уровень деполяризации для деблокирования NMDA-рецепторов от магниевого блока, и косвенно увеличивают поступления кальция в нейрон. Ионотропные глутаматные рецепторы опосредуют быстрые нейронные коммуникации, в то время как в результате трансдукции сигнала через метаботропные рецепторы реализуются более медленные процессы. Метаботропные рецепторы разных типов, экспрессирующиеся как пресинаптически, так и постсинаптически, по-разному модулируют глутаматергическую трансмиссию, принимая участие в реализации феноменов синаптической пластичности, ассоциированных с эмоциональным поведением и когнитивными функциями [18].

Настройка глутаматергической трансмиссии является важным механизмом коммуникации между нейронами, поскольку глутаматергическая система играет решающую роль в синаптической стабильности и пластичности. В этой связи особое внимание привлекает глутаматергическая система гиппокампа, ключевой структуры, участвующей в переработке когнитивной и эмоциональной информации и селективно чувствительной к действию различных стрессорных факторов [1]. Решающее значение как ГК, так и глутамата, для жизнеспособности клеток гиппокампа было отмечено в 90-е годы, когда было показано, что экспрессия в гиппо-

кампе генов, контролируемых рецепторами ГК, необходима в основном для взаимодействия с другими факторами транскрипции (например, CREB, AP-1), хотя не исключалось связывание с чувствительными к гормонам элементами ГК-специфичных генов [19].

В последние годы показано, что хронический избыток ГК вызывает специфический синаптический дефицит в гиппокампе. Важнейшую роль в этом играют возбуждающие глутаматергические синапсы, ключевые участники синаптической передачи, синаптической пластичности и поведенческой адаптации [20, 21]. Физиологический стресс активирует глутаматергические нейроны в гиппокампе, а хронический стресс вызывает дисгомеостаз внеклеточного глутамата. Этот дисгомеостаз усиливается под действием избытка ГК, приводя к изменениям когнитивного и эмоционального поведения. При этом эффекты ГК на глутаматергический синапс зависят от типа и продолжительности воздействия, определяющего уровни и динамику ГК, регион-специфичны, зависят от возраста и пола [21].

В обзоре [22] мы представили общую схему известных в настоящее время механизмов синаптических эффектов ГК, опосредованных МР и ГР, в глутаматергическом синапсе на основе результатов опубликованных ранее исследований [1, 6, 21, 23–26]. Схема предполагает, что в основе высокой пластичности глутаматергических синапсов лежит большое число мишеней прямого или опосредованного влияния ГК, наличие которых и формирует множественность механизмов, вовлеченных в реакцию глутаматергической трансмиссии на ГК. Это дает возможность адекватной реакции организма в каждой конкретной ситуации. Большое число потенциальных механизмов сигнальной трансдукции определяется наличием как мембранных, так и цитоплазматических форм рецепторов ГК с разным сродством (МР и ГР) в глутаматергическом синапсе. Они обеспечивают широкий репертуар путей регуляции синаптической пластичности, реализуемых как немедленно негеномными механизмами, осуществляющими деполаризацию синаптических мембран, так и отложено за счет включения геномных механизмов.

Согласно предложенной схеме, негеномные механизмы опосредованы мембранными рецепторами ГК. В пресинапсе ГК связываются с высокоаффинными МР, регулируя через них возбудимость и высвобождение везикул с глутаматом. Частота высвобождения глутамата контролируется опосредованным G-белком сигнальным путем ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2). Связывание ГК с локализованными в постсинапсе мембранными МР подавляет активацию калиевых каналов, а с мембранными постсинаптическими ГР – ингибирует кальциевые каналы L- и N-типа, а также протеинкиназу C, снижая приток кальция в клетку. Связывание ГК с мембранными постсинаптическими ГР опосредованно (через протеинкиназу A), ингибирует ионотропные NMDA-рецепторы и усиливает гиперполяризацию, регулируя расположенные в постсинаптической области ионотропные рецепторы гамма-аминомасляной кислоты ГАМК<sub>A</sub>. Считается, что геномные механизмы действия ГК на глутаматергическую трансмиссию реализуются главным образом в постсинапсе и в основном трансдукцией сигнала через цитоплазматические ГР, хотя имеются сведения и об участии постсинаптических цитоплазматических МР в реализации длительных эффектов ГК. Свободно диффундируя через клеточную мембрану, ГК связываются в цитоплазме с МР и ГР, вызывая димеризацию рецепторов при участии белков теплового шока. Гомодимер ГР или МР транслоцируется в ядро, где связывается со специфическими участками ДНК glucocorticoid response elements (GRE). С областью GRE, с которой связан гомодимер рецептора ГК, связываются кофакторы и гистон-модифицирующие элементы (histone-modifying elements), в результате чего, в зависимости от природы факторов, связавшихся с этим участком, происходит изменение (инициация или ингибирование) транскрипции, экспрессии генов и синтеза белка. Описаны, хотя и

расцениваются как некоторое исключение, геномные эффект ГК через мембранный ГР, который в определенных условиях может транслоцироваться в ядро и вызывать трансрепрессию или запускать ERK1/2-зависимую транскрипцию генов. Наиболее важные для глутаматергической трансмиссии индуцированные ГК геномные эффекты включают модуляцию экспрессии субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, а также метаболизма и транспорта глюкозы за счет изменения активности ее мембранных транспортеров [22].

Наряду с ионотропными AMPA- и NMDA-рецепторами, функция других глутаматных рецепторов (mGluR1, KA1, GluR6 и GluR7) также регулируется ГК [22]. Эффекты ГК на пластичность, опосредованную глутаматергическими синапсами, продемонстрированы не только в гиппокампе, но и в других структурах мозга, ключевых для когнитивной функции и эмоционального состояния, в первую очередь лимбической системы. Такие данные получены для префронтальной и лобной коры, миндалина и гипоталамуса. Важно, что в различных регионах мозга и даже ядрах и областях одной структуры регуляция глутаматергической трансмиссии ГК может различаться по дозовой и временной зависимости и иметь противоположные эффекты. При этом регион-специфичные эффекты могут касаться различных субъединиц глутаматных рецепторов [22].

Еще один потенциальный механизм контроля ГК функционирования глутаматергического синапса является влияние этих гормонов на физиологию и функционирование астроцитов. В первую очередь это влияние включает ингибирование транспорта глюкозы, снижение синтеза гликогена и снижение поглощения глутамата [27]. Кроме того, возможны косвенные эффекты кортикостероидов на астроциты. ГК снижают уровень серотонина в нейронах, что влияет на функционирование астроцитов, изменяя активность цитокинов и транспорт ГАМК.

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) представляет собой нейротрофин, в избирании экспрессируемый в центральной нервной системе. Он способствует длительному усилению синаптической эффективности, ассоциированной со специфическими процессами обучения и памяти. Одна из ключевых молекул, модулирующих пластичность мозга, BDNF по различным механизмам модулирует глутаматергическую трансмиссию, изменяя экспрессию и активность как ионотропных, так и метаболитных глутаматных рецепторов, а также транспортеров (см. обзор [28]). В ряде исследований продемонстрированы корреляции между экспрессией/функцией BDNF и гормонами надпочечников (главным образом ГК и дегидроэпиандростероном [29]), что может указывать на BDNF-опосредованные механизмы регуляции глутаматергической трансмиссии ГК, которые до настоящего времени остаются недостаточно изученными.

Очевидно, что прямое взаимодействие ГК и глутаматергического синапса через рецепторы ГК не исчерпывает возможные механизмы взаимодействия глутаматергической трансмиссии и ГГНО. Установлено участие возбуждающих аминокислот в контроле высвобождения АКТГ [30]. Активация ионотропных глутаматных рецепторов оказывает стимулирующее действие на высвобождение АКТГ, в то время как роль метаболитных рецепторов еще детально не изучена. Глутаматергическая регуляция высвобождения АКТГ имеет очевидное значение для реакции на стресс. Интересно, что некоторые антидепрессанты, такие как тианептин, которые модулируют высвобождение АКТГ, влияют и на глутаматергическую систему мозга.

## ГИПЕРГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ МОЗГА И ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ

В оптимально функционирующем мозге возбуждающие и тормозные сигналы регулируются и сбалансированы. Нарушение баланса возбуждения и торможения нарушает передачу сигналов и, как следствие, приводит к патологическим изменениям поведения, когнитивных и двигательных функций. Дисбаланс между основными возбуждающим и тормозным медиаторами соответственно глутаматом и  $\gamma$ -аминомасляной кислотой (ГАМК) приводит к нарушениям на уровне синапсов и в итоге к нейродегенерации.

Клеточный гомеостаз глутамата имеет первостепенное значение для нормального функционирования мозга и зависит от сложного метаболического взаимодействия между нейронами и астроцитами [31]. Глиальные клетки, и прежде всего астроциты как компонент глутаматергического синапса, играют важную роль в поддержании этого баланса в норме и нарушениях его в патологических ситуациях [32]. Накапливается все больше доказательств, что патофизиология нервно-психических расстройств, включая расстройства настроения и памяти, связана с нарушением функции и регуляции глутаматергической системы, поэтому гомеостаз глутамата имеет решающее значение для снижения риска различных неврологических и психических заболеваний. Нарушение регуляции глутамата показано как в доклинических моделях неврологических и психических расстройств, так и в клинике [33, 34]. За последние десятилетия получено достаточно фактов о том, что стрессорные события, действуя через ГК и их рецепторы, вызывают целый комплекс изменений глутаматергического сигналинга в лимбической системе мозга, в первую очередь гиппокампе и фронтальной коре, влияющих на когнитивные и эмоциональные процессы [35]. Эти изменения затрагивают пресинаптическое высвобождение глутамата, мембранный трафик и деградацию постсинаптических глутаматных рецепторов, структуру шипиков и сети цитоскелета, а также эпигенетический контроль экспрессии генов. Модификации подвергается и область постсинаптической плотности, сложного субклеточного домена, важного при постсинаптической трансдукции сигналов для точной передачи информации от нейрона к нейрону и реализации синаптической пластичности. Глутаматергическая синаптическая дисфункция, влияющая на морфологию постсинаптической плотности и сигнальные события, была описана при многих нейродегенеративных расстройствах [36].

Эксайтотоксичность – это термин, который описывает токсическое действие возбуждающих нейротрансмиттеров, в первую очередь глутамата. Усиленная или длительная активация глутаматных рецепторов в гиперглутаматергических состояниях (т.е. в ситуациях, сопровождающихся избыточной глутаматергической трансмиссией) запускает каскад, который приводит к развитию нейротоксичности, а в итоге – к потере функции нейронов и гибели клеток. Считается, что опосредованная NMDA-рецепторами эксайтотоксичность является центральным звеном в патогенезе многих заболеваний мозга как неврологических, так и психических, в основе которых лежат нейродегенеративные процессы. Граница между нормальной физиологической функцией и эксайтотоксичностью в значительной степени контролируется астроцитами, поскольку они могут модулировать уровни глутамата в синаптической щели, выводя глутамат и обеспечивая его последующую рециркуляцию через глутамат – глутаминовый цикл [37]. Молекулярный механизм, который вызывает эксайтотоксичность, включает изменения в метаболизме глутамата и кальция, дисфункцию переносчиков глутамата и нарушение работы рецепторов глутамата, в частности NMDA-рецепторов. Эксайтотоксичность можно также рассматривать как следствие или причину других клеточных явлений, в т.ч. митохондриальной дисфункции и окислительного стресса. Поступление кальция через

экстрасинаптические NMDA-рецепторы связано с перегрузкой кальцием митохондрий нейронов. Митохондрии, помимо своей роли в производстве АТФ в клетке, участвуют в гомеостазе кальция, действуя как буферная органелла, поэтому нарушение митохондриального кальциевого гомеостаза ассоциировано с гибелью нейронов либо в результате запуска апоптоза, либо в результате открытия митохондриальной поры [38].

Учитывая ключевую роль глутаматергической трансмиссии в нормальном функционировании мозга, неудивительно, что практически во всех случаях, когда исследования осуществлялись на экспериментальном (модели заболеваний мозга) или клиническом материале от пациентов, были показаны нарушения глутаматергической системы. Эти нарушения имеют свою специфику в зависимости от конкретного патологического состояния, но, как правило, ассоциированы с изменениями в ГГНО, которая, как показано выше, осуществляет контроль глутаматергической трансмиссии. Интересно, что связанные изменения глутаматергической системы мозга и активности ГГНО наблюдаются и при метаболических изменениях в целом организме. Например, диета с высоким содержанием жира в эксперименте на грызунах выявила повышение уровня кортикостерона, аспартата и глутамата на фоне изменений пластичности, опосредованной NMDA-рецепторами, т.е. гиперглутаматергическая активность в гиппокампе была ассоциирована с дисфункцией ГГНО [39].

Экстраординарные возможности синаптической пластичности в гиппокампе определяют его ключевую роль в обучении и памяти, а также регуляции эмоционального состояния, однако обратной стороной такой пластичности является селективная чувствительность к повреждениям, опосредованным ГК (в частности, из-за высокой плотности кортикостероидных рецепторов). Принято считать, что именно эта особенность гиппокампа лежит в основе возникновения и развития когнитивных и эмоциональных расстройств при старении и нейродегенеративных заболеваниях, а прогрессирующее повреждение нейронов гиппокампа за счет гиперглутаматергической трансмиссии, в свою очередь, может быть причиной непрерывной активации ГГНО и повышенной экспрессии вазопрессина и кортикотропин-рилизинг-гормона в гипоталамусе [41–43]. Избыток ГК вызывает также увеличение количества и изменение фенотипа микроглии, способствующие нарушению глутаматергической трансмиссии и потенциально усугубляющие нарушения синаптической пластичности и памяти [44], а нарушение функционирования астроцитов вносит вклад в развитие глутаматной эксайтотоксичности за счет избыточного тока глутамата через мембранные ионотропные и метаболитные рецепторы [45].

Особый интерес представляет взаимодействие глутаматергической системы и ГК в патогенезе болезни Альцгеймера (БА), наиболее распространенной и активно изучаемой формы деменции. Подавляющее большинство случаев БА не имеют известной генетической причины, что делает жизненно важным выявление факторов окружающей среды, участвующих в возникновении и прогрессировании заболевания. Стресс может быть решающим фактором, способствующим развитию БА, что подтверждается огромным числом исследований, хотя механизмы, лежащие в основе этой связи, остаются не до конца ясными [46, 47]. Хронический психосоциальный стресс все чаще признается фактором риска развития спорадической БА. При БА отмечены нарушения функционирования ГГНО, а экспериментальные и клинические данные указывают на то, что при старении и БА гиперсекреция ГК ассоциирована с дисфункцией гиппокампа [48]. Нарушение регуляции ГГНО и повышенный базальный уровень кортизола, которые обнаруживаются у пациентов с БА, вносят значительный вклад в патогенез заболевания [49, 50]. Наблюдаемая гиперсекреция ГК механистически согласуется с предсказанным теоретически

ухудшением состояния гиппокампа при БА и последующим снижением способности ГК ингибировать ГГНО. Показано, что умеренная гиперкортизолемиа, которая проявляется уже на ранних стадиях БА, связана с гиперчувствительностью надпочечников к аденокортикотропному гормону [51]. Интересно, что депрессия является продромальной и составной частью БА, она также может быть триггером для начинающейся БА. Общими механизмами БА и депрессии, которые обеспечивают также коморбидность этих заболеваний, являются нарушение секреции ГК, изменения в глутаматергической трансмиссии, в первую очередь в лимбических структурах, а также развитие нейровоспалительных процессов [1, 52].

Клинические исследования показали, что гиперактивность неокортекса и гиппокампа характерна для пациентов на ранних стадиях заболевания БА, прогрессируя до гипоактивности на более поздних стадиях нейродегенерации. Факторы, способствующие аберрантной возбудимости нейронов, включают аномальные уровни внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и глутамата. Интересно, что гипервозбудимость может быть прогностическим маркером когнитивной дисфункции [53].

На мышах линии APP/PS1, имеющих мутации, характерные для БА, получены важные данные о гиперглутаматергическом сигналинге в гиппокампе в связи с БА-подобными симптомами. Животные изначально когнитивно нормальны, но имеют повышенное высвобождение глутамата в гиппокампе в возрасте 2–4 мес. Показано, что гиперглутаматергическое состояние в гиппокампе этих животных формируется до накопления амилоидных бляшек. В возрасте 6–8 мес. начинают проявляться когнитивные нарушения и накопление амилоидных бляшек в мозге, а очевидная невропатология БА и когнитивные нарушения проявляются в возрасте 10–12 мес. Введение антиглутаматергического препарата рилузола (бензотиазольный антиконвульсант, ингибирующий избыточную глутаматергическую трансмиссию в синапсах за счет блокирования натриевых каналов) в возрасте 2–6 мес., предотвращает снижение когнитивных способностей и восстанавливает нормальный уровень глутаматергической нейротрансмиссии [54]. Это одно из наиболее убедительных доклинических доказательств, подтверждающих непосредственную ассоциацию симптоматики БА с гиперглутаматергическим состоянием [55].

Нарушение синаптической пластичности в связи с изменением функционирования ионотропных и метаботропных глутаматных рецепторов и потеря дендритов происходят на ранних этапах БА [56]. Синаптопатия, сопровождающая БА, ассоциирована с индуцируемым бета-амилоидным пептидом дисбалансом между синаптическими и экстрасинаптическими NMDA-рецепторами и сниженным числом поверхностных AMPA-рецепторов [57].

Сопоставление данных, полученных от пациентов с БА, с функциональными исследованиями на животных моделях заболевания показывает, что на ранних стадиях заболевания накопление токсичных агрегатов бета-амилоида, особенно димеров и низкомолекулярных олигомеров, нарушает обратный захват глутамата, что приводит к его внеклеточному накоплению, вызывающему деполяризацию нейронов. Это вызывает гиперактивацию нейронов и может способствовать их повреждению и дегенерации нейронов из-за нейротоксичности глутамата [58, 59]. Метаболизм глутамата в митохондриях тесно связан с БА. Нарушение баланса метаболизма глутамата в мозге ассоциировано не только с изменением захвата глутамата, его циркуляции, но и с внутриклеточным митохондриальным транспортом и митохондриальным метаболизмом глутамата [60]. Интересно, что изменения уровня глюкозы и глутамата в мозге, которые могут быть следствием дисфункции ГГНО, предшествуют появлению амилоидных бляшек [61].

Высокий уровень кортизола может оказывать нейротоксическое воздействие на гиппокамп, способствуя окислительному стрессу и токсичности бета-амилоидного пептида. Нейроны гиппокампа являются одними из первых нейрональных клеток,

которые дегенерируют в головном мозге пациентов, страдающих БА. Эти нейроны уязвимы к окислительному стрессу, важному звену патогенеза БА. ГК усиливают окислительную гибель клеток, индуцируемую бета-амилоидным пептидом и глутаматом [62, 63], тем самым реализуя пагубное воздействие на когнитивные способности и дальнейшее развитие патологии БА в результате повышенного уровня кортизола.

Установлено, что стресс и его нейрохимические и эндокринные медиаторы вызывают изменения в глутаматных синапсах и сетях, а это, в свою очередь, изменяет психические состояния. Многочисленные данные, полученных на животных моделях депрессии, показали, что секреция ГК при различных типах стресса усиливает высвобождение и трансмиссию сигнала глутамата в лимбических и кортикальных областях мозга и оказывает мощные структурные эффекты, вызывая ремоделирование дендритов, сокращение числа синапсов и сокращение объема структур мозга, подобные тем, которые наблюдаются у пациентов с депрессией [64]. Доклинические исследования на моделях депрессии показали, что ГК оказывают решающее влияние на возбудимость и функцию нейронов, особенно в кортикальных и лимбических областях. Это влияние осуществляется через глутаматергические синапсы как за счет негеномных, так и более медленных, геномных механизмов, запускаемых ГК. Устойчивые изменения глутаматной трансмиссии могут играть ключевую роль в долгосрочных структурных/функциональных изменениях, связанных с расстройствами настроения у пациентов [65]. Иными словами, в настоящее время признается, что глутаматергическая система является основным медиатором психической патологии, и это отражает сдвиг парадигмы от моноаминовой гипотезы депрессии к гипотезе глутамат-зависимой нейропластичности. Гипотеза нейропластичности предполагает, что объемные изменения, постоянно обнаруживаемые в лимбических и кортикальных областях у пациентов с депрессией, в значительной степени обусловлены ремоделированием дендритов и потерей шипиков, вызванным ГК, и что гиперглутаматергические состояния играют ключевую роль в индукции неадаптивных клеточных эффектов, в свою очередь ответственных за неблагоприятные структурные изменения. Косвенным подтверждением гипотезы является тот факт, что препараты, используемые для терапии расстройств настроения/тревоги (антидепрессанты), предотвращают усиленное высвобождение глутамата [66].

Опосредованная глутаматными рецепторами усиленная возбуждающая нейротрансмиссия обычно ассоциируется с эпилепсией мезиальной височной доли со склерозом гиппокампа [67]. Гиперглутаматергическая активность в гиппокампе таких пациентов происходит на фоне повышенного уровня ГК (кортизола) и предполагает как непосредственное, так и опосредованное влияние ГК на глутаматергический синапс. Например, при эпилепсии височной доли изменение триптофан-кинуренинового пути в гиппокампе пациентов способствует формированию с гиперглутаматергического состояния [68], при этом активность этого пути находится под контролем ГК [69]. Важно отметить, что дисфункция глутаматергической системы в лимбических областях мозга, в первую очередь в гиппокампе, ассоциированная с нарушениями функционирования ГГНО, является ключевым звеном коморбидности эпилепсии и депрессии (пациенты с депрессией подвергаются большому риску развития эпилепсии и наоборот) [70, 71].

Еще одним примером заболевания мозга, в патогенезе которого прослеживается дисфункция взаимодействия ГГНО и глутаматергической системы, является шизофрения. Характерная особенность шизофрении – нарушение регуляции ГГНО и системы воспалительного ответа [72]. Полагают, что эти нарушения связаны с изменениями в развитии нервной системы в некоторых областях мозга, таких как гиппокамп, и это может затрагивать главным образом глутаматергические пути, в

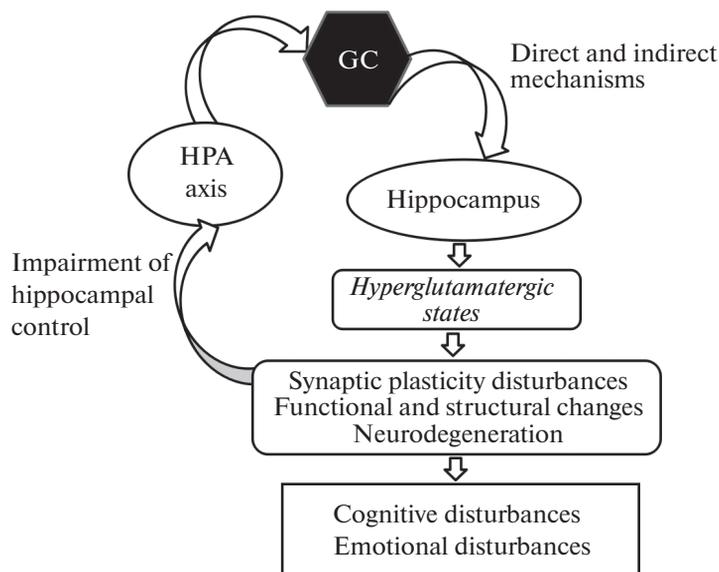
т.ч. за счет дисфункции NMDA-рецепторов. Одним из подтверждений участия глутаматергической дисрегуляции в патофизиологии шизофрении является способность антагонистов NMDA-рецептора, таких как кетамин, индуцировать шизофреноподобное поведение. Это может быть связано с их предполагаемым нейropатологическим действием на ГАМКергические интернейроны, которое может привести к гиперглутаматергическому состоянию. Предполагается, что при шизофрении, наряду с NMDA-рецепторами в ряде регионов мозга нарушено функционирование метаботропных глутаматных рецепторов группы II [73, 74]. Показано, что таламо-кортикальная гиперглутаматергическая трансмиссия при рефрактерной шизофрении связана с нарушениями NMDA-рецепторов и метаботропных глутаматных рецепторов группы III [75]. Окислительный стресс, который играет ключевую роль в патофизиологии шизофрении, ассоциирован с избытком свободных радикалов в результате гиперглутаматергического состояния [76].

Состояния, связанные с патологиями мозга в результате потребления алкоголя или наркотических соединений (как формирование зависимости, так и абстиненция), также ассоциированы с изменениями глутаматергической системы и функции ГГНО. Например, тяжесть синдрома отмены алкоголя, сопровождающегося гиперглутаматергическим состоянием [77], а также повреждение мозга и когнитивные нарушения связаны со степенью нарушения гомеостаза глутамата в мозге [78]. ГК играют важную роль в формировании зависимости от этанола, в частности в повышении пластичности глутаматергических синапсов, связанном с его потреблением, путем влияния на экспрессию эндогенных полиаминов и полиамин-чувствительных субъединиц NMDA-рецепторов [79]. При этом взаимодействия между ГК, полиаминами и NMDA-рецепторами важны как для развития зависимости от этанола, так и для возникновения поведенческих и невропатологических последствий, связанных с синдромом отмены. В формировании гиперглутаматергического состояния при хроническом потреблении алкоголя принимают участие и метаботропные глутаматные рецепторы mGluR1 и mGluR5 [80]. Показано ключевое участие ГГНО в формировании кокаиновой зависимости [81], при которой также отмечаются нарушения регуляции глутаматергической сигнализации. Например, самовведение кокаина и его отмена у крыс вызывает изменения структурной пластичности в прелимбической коре, соответствующие раннему гипоглутаматергическому состоянию, которое затем сменяется гиперглутаматергическим состоянием. Интересно, что мемантин, который временно блокирует NMDA-рецепторы и защищает нейроны от чрезмерной стимуляции избыточным синаптическим глутаматом, способен ослаблять наркотическую зависимость [82].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейроэндокринный контроль, осуществляемый ГГНО, в т.ч. за счет секреции ГК, принципиально важен для поддержания нормального функционирования мозга и баланса между системами возбуждения и торможения. ГК регулируют состояние глутаматергической системы мозга как непосредственно через рецепторы на глутаматергических синапсах, так и опосредованными путями. Неспособность ГГНО адекватно регулировать глутаматергическую синаптическую пластичность приводит к развитию нейропсихических заболеваний, в патогенезе которых ключевую роль могут играть гиперглутаматергические состояния, вызывающие эксайтотоксичность (рис. 1).

Как показано на примерах, приведенных в предыдущей главе, нарушение опосредованного ГР контроля глутаматергических процессов лежит в основе когнитивных и эмоциональных расстройств, эпилепсии и многих других церебральных патологий, т.е. представляет общий базовый механизм для многих болезней мозга



**Рис. 1.** Общая схема ассоциации ГК с гиперглутаматергическими состояниями при патологиях мозга (пояснения в тексте).

и их коморбидностей. Исследование механизмов взаимодействия ГГНО и глутаматергической системы мозга имеет приоритетное трансляционное значение, поскольку знание этих механизмов может послужить основой эффективного предотвращения и терапии как неврологических (в т.ч. нейродегенеративных), так и психических заболеваний.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ.

Работа выполнена в рамках государственного задания.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gulyaeva NV* (2019) Biochemical Mechanisms and Translational Relevance of Hippocampal Vulnerability to Distant Focal Brain Injury: The Price of Stress Response. *Biochemistry (Mosc)* 84: 1306–1328. <https://doi.org/10.1134/S0006297919110087>
2. *Meyer JS* (1985) Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol Rev* 65: 946–1020. <https://doi.org/10.1152/physrev.1985.65.4.946>
3. *Bolshakov AP, Tretyakova LV, Kvichansky AA, Gulyaeva NV* (2021) Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation. *Biochemistry (Mosc)* 86: 156–167. <https://doi.org/10.1134/S0006297921020048>
4. *Uchoa ET, Aguilera G, Herman JP, Fiedler JL, Deak T, de Sousa MB* (2014) Novel aspects of glucocorticoid actions. *J Neuroendocrinol* 26: 557–572. <https://doi.org/10.1111/jne.12157>
5. *de Kloet ER, Meijer OC, de Nicola AF, de Rijk RH, Joëls M* (2018) Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuro-inflammation.

- Front Neuroendocrinol 49: 124–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.02.003>
6. *Prager EM, Johnson LR* (2009) Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Sci Signal* 2(86): re5.  
<https://doi.org/10.1126/scisignal.286re5>
  7. *Gulyaeva NV* (2017) Molecular Mechanisms of Neuroplasticity: An Expanding Universe. *Biochemistry (Mosc)* 82: 237–242.  
<https://doi.org/10.1134/S0006297917030014>
  8. *Xiong H, Krugers HJ* (2015) Tuning hippocampal synapses by stress-hormones: Relevance for emotional memory formation. *Brain Res* 1621: 114–120.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.010>
  9. *Jaszczyk A, Juszcak GR* (2021) Glucocorticoids, metabolism and brain activity. *Neurosci Biobehav Rev* 126: 113–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.007>
  10. *Sapolsky RM* (1993) Potential behavioral modification of glucocorticoid damage to the hippocampus. *Behav Brain Res* 57: 175–182.  
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90133-b](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90133-b)
  11. *Höschl C, Hajek T* (2001) Hippocampal damage mediated by corticosteroids—a neuropsychiatric research challenge. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251 Suppl 2:II81–88.  
<https://doi.org/10.1007/BF03035134>
  12. *Gulyaeva N* (2019) Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. *Neurochem Res* 44: 1306–1322.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2662-0>
  13. *Cox MF, Hascup ER, Bartke A, Hascup KN* (2022) Friend or Foe? Defining the Role of Glutamate in Aging and Alzheimer’s Disease. *Front Aging* 3: 929474.  
<https://doi.org/10.3389/fragi.2022.929474>
  14. *Lalo U, Koh W, Lee CJ, Pankratov Y* (2021) The Tripartite Glutamatergic Synapse. *Neuropharmacology* 199: 108758.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108758>
  15. *Findley CA, Bartke A, Hascup KN, Hascup ER* (2019) Amyloid Beta-Related Alterations to Glutamate Signaling Dynamics during Alzheimer’s Disease Progression. *ASN Neuro* 11.  
<https://doi.org/10.1177/1759091419855541>
  16. *Barco A, Bailey CH, Kandel ER* (2006) Common Molecular Mechanisms in Explicit and Implicit Memory. *J Neurochem* 97 (6): 1520–1533.  
<https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.03870.X>
  17. *Lee MC, Ting KK, Adams S, Brew BJ, Chung R, Guillemain GJ* (2010) Characterisation of the Expression of NMDA Receptors in Human Astrocytes. *PLoS One* 5 (11): e14123.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0014123>
  18. *Hardingham GE, Bading H* (2010). Synaptic versus Extrasynaptic NMDA Receptor Signalling: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Nat Rev Neurosci* 11: 682–696.  
<https://doi.org/10.1038/nrn2911>
  19. *Vreugdenhil E, de Jong J, Schaaf MJ, Meijer OC, Busscher J, Vuijst C, de Kloet ER* (1996) Molecular dissection of corticosteroid action in the rat hippocampus. Application of the differential display techniques. *J Mol Neurosci* 7(2): 135–146.  
<https://doi.org/10.1007/BF02736793>
  20. *Kessels HW, Malinow R* (2009) Synaptic AMPA receptor plasticity and behaviour. *Neuron* 61: 340–350.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.015>
  21. *Timmermans W, Xiong H, Hoogenraad CC, Krugers HJ* (2013) Stress and excitatory synapses: from health to disease. *Neuroscience* 248: 626–636.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.043>
  22. *Gulyaeva NV* (2021) Glucocorticoid Regulation of the Glutamatergic Synapse: Mechanisms of Stress-Dependent Neuroplasticity. *J Evol Biochem Phys* 57: 564–576.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093021030091>
  23. *Joëls M, Pasricha N, Karst H* (2013) The interplay between rapid and slow corticosteroid actions in brain. *Eur J Pharmacol* 719: 44–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.07.015>
  24. *Joëls M, de Kloet ER* (2017) 30 Years of the mineralocorticoid receptor: The brain mineralocorticoid receptor: a saga in three episodes. *J Endocrinol* 234: T49–T66.  
<https://doi.org/10.1530/JOE-16-0660>
  25. *Le Menuet D, Lombès M* (2014) The neuronal mineralocorticoid receptor: from cell survival to neurogenesis. *Steroids* 91: 11–19.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00066>

26. Joëls M, Sarabdjitsingh RA, Karst H (2012) Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes. *Pharmacol Rev* 64: 901–938. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005892>
27. Pretorius E, Marx J (2004) Direct and indirect effects of corticosteroids on astrocyte function. *Rev Neurosci* 15(3): 199–207. <https://doi.org/10.1515/revneuro.2004.15.3.199>
28. Gulyaeva NV (2017) Interplay between Brain BDNF and Glutamatergic Systems: A Brief State of the Evidence and Association with the Pathogenesis of Depression. *Biochemistry (Mosc)* 82: 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.07.015>
29. Pluchino N, Russo M, Santoro AN, Litta P, Cela V, Genazzani AR (2013) Steroid hormones and BDNF. *Neuroscience* 239: 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.025>
30. Jezova D (2005) Control of ACTH secretion by excitatory amino acids: functional significance and clinical implications. *Endocrine* 28(3): 287–294. <https://doi.org/10.1385/ENDO:28:3:287>
31. Andersen JV, Markussen KH, Jakobsen E, Schousboe A, Waagepetersen HS, Rosenberg PA, Aldana BI (2021) Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology* 196: 108719. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719>
32. Sood A, Preeti K, Fernandes V, Khatri DK, Singh SB (2021) Glia: A major player in glutamate-GABA dysregulation-mediated neurodegeneration. *J Neurosci Res* 99: 3148–3189. <https://doi.org/10.1002/jnr.24977>
33. Abulseoud OA, Alasmari F, Hussein AM, Sari Y (2022) Ceftriaxone as a Novel Therapeutic Agent for Hyperglutamatergic States: Bridging the Gap Between Preclinical Results and Clinical Translation. *Front Neurosci* 16: 841036. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.841036>
34. Fairless R, Bading H, Diem R (2021) Pathophysiological Ionotropic Glutamate Signalling in Neuroinflammatory Disease as a Therapeutic Target. *Front Neurosci* 15: 741280. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.741280>
35. Yuen EY, Wei J, Yan Z (2017) Molecular and Epigenetic Mechanisms for the Complex Effects of Stress on Synaptic Physiology and Cognitive Functions. *Int J Neuropsychopharmacol* 20: 948–955. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx052>
36. Moraes BJ, Coelho P, Fão L, Ferreira IL, Rego AC (2021) Modified Glutamatergic Postsynapse in Neurodegenerative Disorders. *Neuroscience* 454: 116–139. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.12.002>
37. Armada-Moreira A, Gomes JI, Pina CC, Savchak OK, Gonçalves-Ribeiro J, Rei N, Pinto S, Moraes TP, Martins RS, Ribeiro FF, Sebastião AM, Crunelli V, Vaz SH (2020) Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci* 14: 90. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00090>
38. Mira RG, Cerpa W (2021) Building a Bridge Between NMDAR-Mediated Excitotoxicity and Mitochondrial Dysfunction in Chronic and Acute Diseases. *Cell Mol Neurobiol* 41(7): 1413–1430. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00924-0>
39. Lim SI, Song KH, Yoo CH, Woo DC, Choe BY (2018) High-fat diet-induced hyperglutamatergic activation of the hippocampus in mice: A proton magnetic resonance spectroscopy study at 9.4T. *Neurochem Int* 114: 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.12.007>
40. Гуляева НВ (2020) Физиологический континуум пластичности и патологии нервной системы. *Интегра́т физиол* 1: 294–302. [Gulyaeva NV (2020) Physiological continuum of plasticity and pathology of the nervous system. *Integrat Physiol* 1: 294–302. (In Russ)]. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-4-294-302>
41. Lupien SJ, Nair NP, Briere S, Maheu F, Tu MT, Lemay M, McEwen BS, Meaney MJ (1999) Increased cortisol levels and impaired cognition in human aging: implication for depression and dementia in later life. *Rev Neurosci* 10: 117–139. <https://doi.org/10.1515/revneuro.1999.10.2.11710658955>
42. Magri F, Cravello L, Barili L, Sarra S, Cinchetti W, Salmoiraghi F, Micale G, Ferrari E (2006) Stress and dementia: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging Clin Exp Res* 18(2): 167–170. <https://doi.org/10.1007/BF03327435>
43. Justice NJ (2018) The relationship between stress and Alzheimer’s disease. *Neurobiol Stress* 8: 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2018.04.002>

44. *Sanguino-Gómez J, Buurstede JC, Abiega O, Fitzsimons CP, Lucassen PJ, Eggen BJL, Lesuis SL, Meijer OC, Krugers HJ.* (2022) An emerging role for microglia in stress-effects on memory. *Eur J Neurosci* 55: 2491–2518.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.15188>
45. *Kim E, Otgontenger U, Jamsranjav A, Kim SS* (2020) Deleterious Alteration of Glia in the Brain of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 21(18): 6676.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21186676>
46. *Escher CM, Sannemann L, Jessen F* (2019) Stress and Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 126(9): 1155–1161.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-019-01988-z>
47. *Lyons CE, Bartolomucci A* (2020) Stress and Alzheimer's disease: A senescence link? *Neurosci Biobehav Rev* 115: 285–298.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.05.010>
48. *Polleri A, Gianelli MV, Murialdo G* (2002) Dementia: a neuroendocrine perspective. *J Endocrinol Invest* 25: 73–83.  
<https://doi.org/10.1007/BF03343964>
49. *Saelzler UG, Verhaeghen P, Panizzon MS, Moffat SD* (2021) Intact circadian rhythm despite cortisol hypersecretion in Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 132: 105367.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105367>
50. *Milligan Armstrong A, Porter T, Quek H, White A, Haynes J, Jackaman C, Villemagne V, Munyard K, Laws SM, Verdile G, Groth D* (2021) Chronic stress and Alzheimer's disease: the interplay between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, genetics and microglia. *Biol Rev Camb Philos Soc* 96(5): 2209–2228.  
<https://doi.org/10.1111/brv.12750>
51. *Notarianni E* (2017) Cortisol: Mediator of association between Alzheimer's disease and diabetes mellitus? *Psychoneuroendocrinology* 81: 129–137.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.04.008>
52. *Herbert J, Lucassen PJ* (2016) Depression as a risk factor for Alzheimer's disease: Genes, steroids, cytokines and neurogenesis – What do we need to know? *Front Neuroendocrinol* 41: 153–171.  
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.12.001>
53. *Targa Dias Anastacio H, Matosin N, Ooi L* (2022) Neuronal hyperexcitability in Alzheimer's disease: what are the drivers behind this aberrant phenotype? *Transl Psychiatry* 12(1): 257.  
<https://doi.org/10.1038/s41398-022-02024-7>
54. *Hascup KN, Findley CA, Britz J, Esperant-Hilaire N, Broderick SO, Delfino K, Tischkau S, Bartke A, Hascup ER* (2021) Riluzole attenuates glutamatergic tone and cognitive decline in A $\beta$ PP/PS1 mice. *J Neurochem* 156(4): 513–523.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.15224>
55. *Gulyaeva NV* (2021) Hippocampal hyperglutamatergic signaling matters: Early targeting glutamate neurotransmission as a preventive strategy in Alzheimer's disease: An Editorial Highlight for “Riluzole attenuates glutamatergic tone and cognitive decline in A $\beta$ PP/PS1 mice”. *J Neurochem* 156: 399–402.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.15238>
56. *Srivastava A, Das B, Yao AY, Yan R* (2020) Metabotropic Glutamate Receptors in Alzheimer's Disease Synaptic Dysfunction: Therapeutic Opportunities and Hope for the Future. *J Alzheimers Dis* 78): 1345–1361.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-201146>
57. *Babaei P* (2021) NMDA and AMPA receptors dysregulation in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 908: 174310.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174310>
58. *Conway ME* (2020) Alzheimer's disease: targeting the glutamatergic system. *Biogerontology* 21(3): 257–274.  
<https://doi.org/10.1007/s10522-020-09860-4>
59. *Zott B, Konnerth A* (2022) Impairments of glutamatergic synaptic transmission in Alzheimer's disease. *Semin Cell Dev Biol*.S1084-9521(22)00080-5.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.03.013>
60. *Song J, Yang X, Zhang M, Wang C, Chen L* (2021) Glutamate Metabolism in Mitochondria is Closely Related to Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 84: 557–578.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-210595>
61. *Bukke VN, Archana M, Villani R, Romano AD, Wawrzyniak A, Balawender K, Orkisz S, Beggiano S, Serviddio G, Cassano T* (2020) The Dual Role of Glutamatergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease: From Pathophysiology to Pharmacotherapy. *Int J Mol Sci* 21: 7452.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21207452>

62. *Behl C* (1998) Effects of glucocorticoids on oxidative stress-induced hippocampal cell death: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 33: 689–696. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(98\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(98)00019-9)
63. *Ouanes S, Popp J* (2019) High Cortisol and the Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: A Review of the Literature. *Front Aging Neurosci* 11: 43. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00043>
64. *Sanacora G, Treccani G, Popoli M* (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62(1): 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.036>
65. *Musazzi L, Treccani G, Popoli M* (2015) Functional and structural remodeling of glutamate synapses in prefrontal and frontal cortex induced by behavioral stress. *Front Psychiatry* 6:60. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00060>
66. *Musazzi L, Racagni G, Popoli M* (2011) Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. *Neurochem Int* 59(2): 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.05.002>
67. *Banerjee J, Dey S, Dixit AB, Tripathi M, Doddamani R, Sharma MC, Chandra PS* (2020)  $\alpha 7$  nicotinic receptors contributes to glutamatergic activity in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (MTLE- HS). *J Neural Transm (Vienna)* 127(10): 1441–1446. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02239-2>
68. *Dey S, Banerjee Dixit A, Tripathi M, Doddamani RS, Sharma MC, Lalwani S, Chandra PS, Banerjee J* (2021) Altered hippocampal kynurenine pathway metabolism contributes to hyperexcitability in human mesial temporal lobe epilepsy-hippocampal sclerosis. *Br J Pharmacol* 178(19): 3959–3976. <https://doi.org/10.1111/bph.15534>
69. *Jamshed L, Debnath A, Jamshed S, Wish JV, Raine JC, Tomy GT, Thomas PJ, Holloway AC* (2022) An Emerging Cross-Species Marker for Organismal Health: Tryptophan-Kynurenine Pathway. *Int J Mol Sci* 23: 6300. <https://doi.org/10.3390/ijms23116300>
70. *Kanner AM* (2009) Depression and epilepsy: do glucocorticoids and glutamate explain their relationship? *Curr Neurol Neurosci Rep* 9: 307–312. <https://doi.org/10.1007/s11910-009-0046-1>
71. *Gulyaeva NV* (2021) Stress-Associated Molecular and Cellular Hippocampal Mechanisms Common for Epilepsy and Comorbid Depressive Disorders. *Biochemistry (Mosc)* 86: 641–656. <https://doi.org/10.1134/S0006297921060031>
72. *Altamura AC, Boin F, Maes M* (1999) HPA axis and cytokines dysregulation in schizophrenia: potential implications for the antipsychotic treatment. *Eur Neuropsychopharmacol* 10: 1–4. [https://doi.org/10.1016/s0924-977x\(99\)00017-6](https://doi.org/10.1016/s0924-977x(99)00017-6)
73. *Martínez-Piñeño A, García-Cerro S, Mas S, Torres T, Boloc D, Rodríguez N, Lafuente A, Gassó P, Arnáiz JA, Parellada E* (2020) The positive allosteric modulator of the mGlu2 receptor JNJ-46356479 partially improves neuropathological deficits and schizophrenia-like behaviors in a postnatal ketamine mice model. *J Psychiatr Res* 126: 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.04.005>
74. *Lum JS, Millard SJ, Huang XF, Ooi L, Newell KA* (2018) A postmortem analysis of NMDA ionotropic and group I metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens in schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci* 43: 102–110. <https://doi.org/10.1503/jpn.170077>
75. *Fukuyama K, Kato R, Murata M, Shiroyama T, Okada M* (2019) Clozapine Normalizes a Glutamatergic Transmission Abnormality Induced by an Impaired NMDA Receptor in the Thalamocortical Pathway via the Activation of a Group III Metabotropic Glutamate Receptor. *Biomolecules* 9: 234. <https://doi.org/10.3390/biom9060234>
76. *Limongi R, Jeon P, Théberge J, Palaniyappan L* (2021) Counteracting Effects of Glutathione on the Glutamate-Driven Excitation/Inhibition Imbalance in First-Episode Schizophrenia: A 7T MRS and Dynamic Causal Modeling Study. *Antioxidants (Basel)* 10: 75. <https://doi.org/10.3390/antiox10010075>
77. *Wang G, Weber-Fahr W, Frischknecht U, Hermann D, Kiefer F, Ende G, Sack M* (2021) Cortical Glutamate and GABA Changes During Early Abstinence in Alcohol Dependence and Their Associations With Benzodiazepine Medication. *Front Psychiatry* 12: 656468. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.656468>
78. *Laniepce A, Cabé N, André C, Bertran F, Boudehent C, Lahbairi N, Maillard A, Mary A, Segobin S, Vabret F, Rauchs G, Pitel AL* (2020) The effect of alcohol withdrawal syndrome severity on sleep, brain and cognition. *Brain Commun* 2:fcaa123. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa123>

79. *Prendergast MA, Mulholland PJ* (2012) Glucocorticoid and polyamine interactions in the plasticity of glutamatergic synapses that contribute to ethanol-associated dependence and neuronal injury. *Addict Biol* 17: 209–223.  
<https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00375.x>
80. *Laukkanen V, Kärkkäinen O, Kautiainen H, Tiihonen J, Storvik M* (2019) Increased [<sup>3</sup>H]quisqualic acid binding density in the dorsal striatum and anterior insula of alcoholics: A post-mortem whole-hemisphere autoradiography study. *Psychiatry Res Neuroimaging* 287: 63–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.04.002>
81. *Hadad NA, Schwendt M, Knackstedt LA* (2020) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in post-traumatic stress disorder and cocaine use disorder. *Stress*. 23(6): 638–650.  
<https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1803824>
82. *Montemitro C, Angebrandt A, Wang TY, Pettorruso M, Abulseoud OA* (2021) Mechanistic insights into the efficacy of memantine in treating certain drug addictions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 111: 110409.  
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110409>

### **Neuroendocrine Control of Hyperglutamatergic States in Brain Pathologies: The Effects of Glucocorticoids**

**N. V. Gulyaeva<sup>a, b, \*</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia*

<sup>b</sup>*Solovyov Scientific and Practical Psychoneurological Center, Moscow, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: nata\_gul@ihna.ru*

Neuroendocrine control mediated by glucocorticoids is important for maintaining the normal functioning of the brain and the balance between the excitation and inhibition systems. Glucocorticoids regulate the state of the glutamatergic system of the brain both directly, through receptors on glutamatergic synapses, and indirectly. Impaired functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its inability to optimally regulate glutamatergic synaptic plasticity leads to the development of neuropsychic diseases, and hyperglutamatergic conditions can play a key role in their pathogenesis. Disturbances in glucocorticoid control of glutamatergic processes underlies cognitive and emotional disorders, epilepsy and a number of other cerebral pathologies, being a common mechanism for the development of many brain diseases and their comorbidities. In this regard, the study of the mechanisms of interaction between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the glutamatergic system of the brain has priority translational significance.

*Keywords:* hypothalamic–pituitary–adrenal axis, glucocorticoids, glutamatergic synapse, hyperglutamatergic states, hippocampus, brain diseases, neurodegeneration

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**РЕЦЕПТОР ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА: РОЛЬ В РАЗВИТИИ  
ТИРЕОИДНОЙ ПАТОЛОГИИ И ПЕРСПЕКТИВНАЯ МИШЕНЬ  
ДЛЯ ЕЕ КОРРЕКЦИИ**

© 2022 г. Е. А. Фокина<sup>а</sup>, \*, А. О. Шпаков<sup>а</sup>

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

\* *E-mail: fokina-katrina@yandex.ru*

Поступила в редакцию 10.08.2022 г.

После доработки 12.08.2022 г.

Принята к публикации 12.08.2022 г.

Одним из ключевых компонентов, ответственных за ответ щитовидной железы на стимуляцию тиреотропным гормоном (ТТГ), является рецептор ТТГ, относящийся к суперсемейству G-белок-сопряженных рецепторов. Связывание ТТГ или стимулирующих аутоантител с внеклеточным доменом рецептора ТТГ приводит к запуску множества сигнальных путей в клетках-мишенях, которые реализуются через различные типы G-белков и  $\beta$ -аррестины. Ингибирующие аутоантитела, напротив, подавляют активность рецептора ТТГ, индуцируя гипотиреоидные состояния. Активирующие мутации приводят к конститутивно активным формам рецептора ТТГ и могут стать триггером онкологических заболеваний. В соответствии с этим, рецептор ТТГ является одной из ключевых мишеней для регуляции функций щитовидной железы и тиреоидного статуса, а также для коррекции заболеваний, обусловленных изменением активности рецептора ТТГ (аутоиммунные гипертиреоз и гипотиреоз, офтальмопатия Грейвса, тиреоидный рак). Препараты ТТГ исключительно редко применяются в медицине, что обусловлено их иммуногенностью и серьезными побочными эффектами. Наибольшие перспективы связывают с разработкой низкомолекулярных аллостерических регуляторов рецептора ТТГ с активностью полных и инверсионных агонистов и нейтральных антагонистов. Они способны проникать в аллостерический сайт, расположенный в трансмембранном домене рецептора ТТГ, и специфично связываться с ним, контролируя, тем самым, способность рецептора взаимодействовать с G-белками и  $\beta$ -аррестинами. Аллостерические регуляторы не влияют на связывание ТТГ и аутоантител с рецептором, что создает возможности для мягкой и селективной регуляции функций щитовидной железы без критических изменений уровня ТТГ и тиреоидных гормонов. Современному состоянию проблемы регуляции активности рецептора ТТГ, в том числе с помощью лигандов его аллостерических сайтов, посвящен настоящий обзор.

*Ключевые слова:* рецептор тиреотропина, тиреотропный гормон, аллостерический регулятор, щитовидная железа, трансмембранный домен, тиреоидный гормон, аутоиммунный гипертиреоз

DOI: 10.31857/S0869813922090060

## ВВЕДЕНИЕ

Широкая распространенность тиреоидной патологии в человеческой популяции делает проблему поиска эффективных подходов для ее коррекции чрезвычайной

но актуальной. Встречаемость дисфункций щитовидной железы (ЩЖ) в мире варьирует от 10 до 30%, в зависимости от особенностей рациона на данной территории, ее удаленности от моря, а также наличия вредных экологических воздействий [1]. Заболевания ЩЖ представляют гетерогенную группу эндокринной патологии, однако патогенез большинства из них связан с повышенной или, напротив, сниженной активностью рецептора тиреотропного гормона (ТТГ), основной мишени ТТГ в фолликулярных клетках ЩЖ, ответственных за синтез тиреоидных гормонов. Все это делает рецептор ТТГ привлекательной мишенью для разработки новых фармакологических подходов, направленных на восстановление функций ЩЖ и нормализацию тиреоидного статуса. Перед тем, как приступить к анализу структурно-функциональной организации рецептора ТТГ и механизмов регуляции его активности, кратко остановимся на заболеваниях ЩЖ и имеющихся в настоящее время путях их коррекции.

*Наиболее распространенные заболевания тиреоидной системы  
Гипертиреоз (болезнь Грейвса)*

Аутоиммунный гипертиреоз, или болезнь Грейвса, считается одной из наиболее распространенных патологий ЩЖ. Не существует единого мнения относительно факторов, безусловно приводящих к ее развитию, однако наибольшее значение среди них имеют генетическая предрасположенность и женский пол [2]. Патогенез болезни Грейвса заключается в образовании стимулирующих аутоантител к внеклеточному домену рецептора ТТГ, что нередко сопровождается снижением иммунной толерантности к другим компонентам системы синтеза тиреоидных гормонов, таким как тиреопероксидаза и тиреоглобулин. Гиперактивация рецептора ТТГ стимулирующими аутоантителами приводит к неконтролируемому повышению уровня тиреоидных гормонов в крови пациента с последующей реализацией их системных метаболических эффектов на ткани-мишени, что приводит к клинической картине гипертиреоза.

Лечение болезни Грейвса связано в основном с эрадикацией избытка гормонов, либо путем блокирования их синтеза, либо путем уменьшения объема ткани ЩЖ. Все используемые подходы сопряжены с рядом осложнений. Несмотря на то, что производные тионамида, представляющие собой наиболее широко применяемую группу антитиреоидных препаратов, обладают благоприятным профилем безопасности, их применение приводит к ряду нежелательных побочных эффектов, таким как агранулоцитоз, васкулиты, поражение печени, кожные реакции [3]. Помимо этого, лечение антитиреоидными препаратами не позволяет избежать высокого риска рецидива основного заболевания в течение двух лет после отмены терапии [4]. Радиойодтерапия, которая является следующей ступенью в стратегии лечения болезни Грейвса, характеризуется отсроченным эффектом, что вызывает потребность одновременно с ней назначать антитиреоидные препараты [5]. Хирургическое лечение сопряжено с рисками осложнения оперативного вмешательства, такими как кровотечение, инфекционные осложнения, эстетические дефекты, паралич гортанного нерва, гипопаратиреоз [6]. Кроме того, пациенты, перенесшие тотальную тиреоидэктомию, вынуждены пожизненно принимать препараты L-тироксина в связи со значительно выраженным послеоперационным гипотиреозом.

Такое разнообразие побочных эффектов и не всегда простые пути их коррекции создают острую необходимость в поиске качественно новых фармакологических подходов для лечения гипертиреоидных состояний. Наиболее интересной представляется так называемая таргетная терапия, которая позволяет воздействовать на конкретное звено патогенеза, в частности – на рецептор ТТГ, мишень стимулирующих рецептор ТТГ аутоантител. Среди таких подходов рассматриваются приме-

нение аутоантител, способных блокировать рецептор ТТГ, а также низкомолекулярные аллостерические антагонисты этого рецептора. Препараты аутоантител к рецептору ТТГ находятся на разных фазах клинических испытаний и позиционируются как весьма перспективная группа анти tireоидных препаратов [7]. Аллостерические регуляторы, модифицирующие активность рецептора ТТГ, будут рассмотрены далее и более подробно.

### *Eunotiureoz*

Предрасполагающими факторами к развитию гипотиреоза, в том числе аутоиммунного, являются отягощенный семейный анамнез, женский пол, но наибольший вклад в развитие этой патологии ЩЖ вносит дефицит алиментарного йода. Сочетание факторов приводит к выработке аутоантител к различным звеньям синтеза тиреоидных гормонов, в том числе – к рецептору ТТГ [8]. Классическим подходом для лечения гипотиреоза любой этиологии является заместительная терапия препаратами тиреоидных гормонов, в первую очередь L-тироксина. Заместительная терапия является относительно безопасной, и побочные эффекты, как правило, обусловлены передозировкой и ятрогенным избытком тироксина [9]. Следует, однако, отметить, что часть пациентов с гипотиреозом имеют индивидуальную непереносимость к препаратам тироксина, что затрудняет их лечение в связи с отсутствием альтернативных подходов.

Перспективными подходами, способными стать альтернативой существующему стандарту терапии, является создание селективных агонистов рецепторов тиреоидных гормонов [10] и аллостерических агонистов рецептора ТТГ [11]. Механизм действия агонистов рецепторов тиреоидных гормонов состоит в специфичном связывании с  $\beta$ -изоформой этих рецепторов, следствием чего является потенцирование физиологических эффектов тиреоидных гормонов – тироксина и трийодтиронина. Однако для некоторых тиромиметиков уже на ранних этапах клинических исследований были показаны отчетливо выраженные токсические эффекты, обусловленные разрушением хрящевой и костной ткани [12]. Помимо этого, применение агонистов рецепторов тиреоидных гормонов связано со значительным риском развития осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы. Селективные аллостерические агонисты рецептора ТТГ являются малоизученной, но при этом очень интересной группой препаратов, спектр клинического применения не ограничивается гипотиреозом и может быть расширен на различные метаболические заболевания, сопровождающиеся ослаблением функций ЩЖ, такие как ожирение и сахарный диабет различной этиологии. Они будут рассмотрены в соответствующем разделе.

## РЕЦЕПТОР ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА КАК ПРЕДСТАВИТЕЛЬ СУПЕРСЕМЕЙСТВА GPCR

Рецептор ТТГ относится к большому суперсемейству рецепторов, сопряженных с гетеротримерными G-белками (GPCR). Общей их особенностью является наличие трансмембранного домена, состоящего из семи гидрофобных спиральных сегментов (transmembrane helices, ТМН). Несмотря на сходную топологию в мембране, аминокислотные последовательности этих ТМН и их взаимное расположение могут значительно отличаться у разных семейств GPCR, что приводит к различной конфигурации расположенных внутри трансмембранного домена сайтов [13]. Наибольшая вариабельность первичной структуры GPCR характерна для внеклеточного домена, который в случае рецептора ТТГ непосредственно связывает лиганд, а в большинстве GPCR отвечает за первичное опознавание лиганда. Расположенные в цитоплазме внутриклеточные петли GPCR ответственны за активацию гете-

ротимерных G-белков, функциональное взаимодействие с  $\beta$ -аррестинами и другими регуляторами GPCR-сигналинга, а также являются мишенями GPCR-специфичных протеинкиназ. В настоящее время у человека выявлено до 800 GPCR, функции которых простираются от контроля зрительной функции и вкуса до регуляции репродуктивных и метаболических процессов и нейротрансмиссии. Именно поэтому GPCR являются наиболее популярной терапевтической мишенью при лечении множества патологий, и более 30% всех фармакологических препаратов прямо или опосредованно действуют на эти рецепторы [14].

Суперсемейство GPCR можно разделить на подсемейства на основе филогенетического анализа их первичных структур, а также топологии рецепторов в мембране [15]. Подсемейство рецепторов гликопротеиновых гормонов включает рецепторы ТТГ и гонадотропинов – фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов, и относится к более крупному семейству А, называемому также семейством родопсина. Особенностью рецепторов ТТГ, ФСГ и ЛГ является наличие исключительно больших внеклеточных доменов (эктодоменов), содержащих до 340–420 аминокислотных остатков и включающих обогащенные остатками лейцина повторы. Эти рецепторы возникли в результате слияния двух белковых молекул – “классического” GPCR с гептагеликальным трансмембранным доменом и гидрофильного  $\beta$ -складчатого белка с регулярной структурой, содержащего около десяти обогащенных остатками лейцина повторов [16]. Показано, что аминокислотная последовательность рецептора ТТГ, как и рецепторов гонадотропинов, у различных представителей позвоночных животных характеризуется сравнительно высокой степенью консервативности. Значимые различия между рецепторами ТТГ, в том числе среди высших приматов, обусловлены различиями в посттрансляционных модификациях рецепторной молекулы, в первую очередь на уровне ее N-гликозилирования. При сравнении различных классов позвоночных, рыб и млекопитающих различия в первичной структуре рецептора ТТГ ожидаемо выше. При этом степень гомологии первичной структуры рецепторов ТТГ у лососевых с таковыми у млекопитающих (человек, грызуны) достаточно высокая, несмотря на 100 миллионов лет, прошедших со времени дивергенции представителей этих таксонов. В то же время различие первичной структуры этих рецепторов с таковыми у костистых рыб, напротив, очень значимое, что может быть обусловлено более высокой скоростью накопления мутаций в рецепторах ТТГ последних [17]. Большая часть различий в первичной структуре рецепторов ТТГ различных представителей позвоночных сконцентрирована в N-концевом пептиде и во внутриклеточном хвосте, в то время как внеклеточный лиганд-связывающий домен и трансмембранный домен характеризуются высокой степенью консервативности.

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРА ТТГ

### *Внеклеточный домен (эктодомен)*

Внеклеточный домен рецепторов гликопротеиновых гормонов, в том числе рецептора ТТГ, включает две отдельные области: N-концевую, содержащую обогащенные остатками лейцина повторы, и шарнирную, которая соединяет эктодомен с трансмембранным доменом. В обогащенной лейцинами N-концевой области рецептора ТТГ локализованы 11 последовательно расположенных повторяющихся сегментов длиной 20–30 аминокислотных остатков, каждый из которых состоит из  $\beta$ -тяжа и  $\alpha$ -спирали. Они формируют внутреннюю полость, в которой локализован высокоаффинный (ортостерический) сайт, ответственный за связывание с гормоном [18]. Внутреннюю поверхность этой полости формируют боковые алкильные группы гидрофобных аминокислот, в то время как снаружи оказываются боковые радикалы ароматических аминокислот. Расположенный на C-конце повторяю-

щийся сегмент содержит два остатка цистеина, которые образуют дисульфидные мостики с остатками цистеина, локализованными в шарнирной области, что приводит к стабилизации неактивной конформации рецептора ТТГ. При этом замена цистеинов на остатки серина, неспособных к образованию дисульфидных мостиков, вызывает перманентную активацию рецептора [19].

В настоящее время роль шарнирной области эктодомена рецепторов гликопротеиновых гормонов в процессе связывания гормона и трансдукции сигнала в клетку интенсивно исследуется. Эта область содержит сайты, которые способны подвергаться модификации N-гликанами и сульфатированию, что указывает на ее определяющую роль в регуляции функциональной активности рецептора [20]. В 2012 г. Jiang и соавт., изучая рецептор ФСГ, продемонстрировали критическое значение сульфатированного остатка Tyr<sup>335</sup> в его шарнирной области как дополнительного, второго сайта для взаимодействия с ФСГ [21]. Сходную функцию эта область играет и в рецепторе ТТГ, поскольку сульфатирование Tyr<sup>385</sup> необходимо для активации рецептора лигандом [22], причем для рецептора ТТГ шарнирная область играет ключевую роль в узнавании лиганда и обеспечивает специфичность взаимодействия ТТГ с его рецептором [23, 24]. Имеются основания считать, что шарнирная область в рецепторах ТТГ и гонадотропинов может взаимодействовать в большей степени не с  $\beta$ -субъединицами гормонов, которые определяют их индивидуальность, а с общими для ТТГ и гонадотропинов  $\alpha$ -субъединицами, функции которых состоят в физическом воздействии  $\alpha\beta$ -гетеродимерного гипофизарного гормона на внеклеточные петли и трансмембранный домен рецептора. Так, после связывания рецептора с молекулой гормона шарнирная область “втягивается” в карман, расположенный между N-концевым областью, включающей лейцинобогатые повторы, и внешним входом в трансмембранный домен. Поскольку N-концевая часть эктодомена оказывает ингибирующее влияние на способность переходить в активированную конформацию, необходимую для передачи сигнала к гетеротримерным G-белкам и внутриклеточным эффекторам [25, 26], то разобщение эктодомена и трансмембранного домена вследствие такого втягивания шарнирной области в интерфейс между ними приводит к “снятию” ингибирующего влияния эктодомена и активации рецептора. В пользу этого механизма свидетельствует то, что удаление эктодомена рецептора ТТГ приводит к переходу рецептора в перманентно активируемую форму, нечувствительную к ТТГ и стимулирующим антителам [27]. Важную роль в реализации механизма активации рецептора ТТГ может играть меняющееся в ходе активации рецептора ТТГ местоположение небольшого декапептидного фрагмента, расположенного на C-конце шарнирной области, непосредственно перед первым трансмембранным участком (ТМН1), называемым “внутренним инверсионным агонистом” [28]. Этот фрагмент встраивается между внешними концами ТМН рецептора и препятствует передаче сигнала в отсутствие лиганда. При связывании рецептора с гормоном, вследствие изменения конформации шарнирной области, пептидный фрагмент извлекается из входа в трансмембранный канал рецептора, что приводит к активации сигнальной трансдукции [29]. Наряду с влиянием на активированную конформацию рецептора ТТГ в ходе его связывания с гормоном, шарнирная область может быть мишенью для стимулирующих аутоантител, образующихся при аутоиммунном гипертиреозе [30]. Аутоантитела к шарнирной области, выявляемые у некоторых пациентов с болезнью Грейвса, хотя напрямую и не активируют рецептор, но способны влиять на посттрансляционные модификации этого участка, в первую очередь на сульфатирование тирозиновых остатков и, тем самым, осуществляют модуляцию ответа рецептора ТТГ на взаимодействие со стимулирующими его аутоантителами [31].

Исключительно важную роль в функционировании рецептора ТТГ играет модификация его внеклеточной части N-гликанами по остаткам аспарагина, мишеням

для N-гликозилирования [32]. N-гликаны, как правило, имеют отрицательный заряд и опосредуют эффективное связывание с молекулой ТТГ, которая также гликозилирована как по ее  $\alpha$ -, так и по  $\beta$ -субъединице [33]. В N-концевом домене рецептора ТТГ, содержащем лейцин-обогащенные повторы, локализовано пять сайтов для N-гликозилирования, в то время как в шарнирной области имеется еще один такой сайт. Показано, что в функционально активном состоянии рецептор должен быть гликозилирован, по крайней мере, по четырем сайтам для N-гликозилирования [34]. Рецептор ТТГ может быть гликозилирован по аспарагину в положениях 77, 99, 113, 177, 198 и 302, среди которых Asp<sup>113</sup> является специфичным для рецептора ТТГ человека, в то время как Asp<sup>177</sup> – для рецепторов ТТГ других млекопитающих, в то время как остальные остатки аспарагина представляют собой эволюционно консервативные сайты для N-гликозилирования [33, 35]. Из всех сайтов наибольшее влияние на функциональную активность рецептора оказывает гликозилирование по Asp<sup>77</sup>, поскольку замена этого остатка на близкий по физико-химическим свойствам глутамин приводит к полной потере мутантным рецептором биологической активности, в то время как, например, замена остатка Asp<sup>113</sup> на глутамин лишь снижает аффинность рецептора к гормону [36]. Судя по всему, гликозилирование по остальным сайтам заметно не влияет на сродство рецептора к лиганду и на его способность в ТТГ-связанном состоянии опосредовать повышение внутриклеточного уровня цАМФ.

#### *Трансмембранный домен*

Поскольку до настоящего времени не получено экспериментальных данных кристаллографии по рецептору ТТГ и другим рецепторам гликопротеиновых гормонов, то информация о пространственной структуре их трансмембранных доменов и о конформационных изменениях в них при связывании с гормонами базируется исключительно на гомологических моделях. Эти модели строятся на основе GPCR того же класса А, для которых имеются данные рентгеноструктурного анализа, среди них  $\beta$ -адренергические и аденозиновые рецепторы, а также светочувствительный рецепторный белок родопсин [29]. На основании анализа гомологии аминокислотных последовательностей трансмембранных доменов полагают, что наиболее близким рецептору ТТГ по пространственной организации является трансмембранный домен  $\beta_2$ -адренергического рецептора [37]. Однако это предположение имеет ряд значимых ограничений. Так, в отличие от большинства GPCR класса А высококонсервативный остаток пролина, локализованный в ТМН5 (в положении  $5 \times 50$ ), в рецепторе ТТГ заменен на остаток аланина [29]. Как известно, остаток пролина относится к спиралеразрушающим остаткам, и его локализация в середине ТМН5 генерирует в нем жесткий излом, что способствует формированию объемистого кармана внутри трансмембранного канала, который может выступать в качестве лиганд-связывающего сайта, как это показано, например, для  $\beta$ -адренергических рецепторов. Отсутствие пролина в рецепторе ТТГ приводит к тому, что ТМН5 в нем формирует правильную альфа-спираль без нарушающих ее целостность изгибов. Другим важным отличием рецептора ТТГ является замена характерного для GPCR класса А объемного остатка триптофана в ТМН6 (в положении  $6 \times 48$ ) на сравнительно небольшой метионин, что также способствует формированию более компактного кармана внутри трансмембранного канала рецептора. В пользу функциональной важности этой замены свидетельствует то, что обратная замена метионина на триптофан приводит к конститутивно активному мутантному рецептору ТТГ [29].

Трансмембранный домен играет ключевую роль в активации рецептора и передаче гормонального сигнала на трансдукторные звенья ТТГ-сигнальных путей.

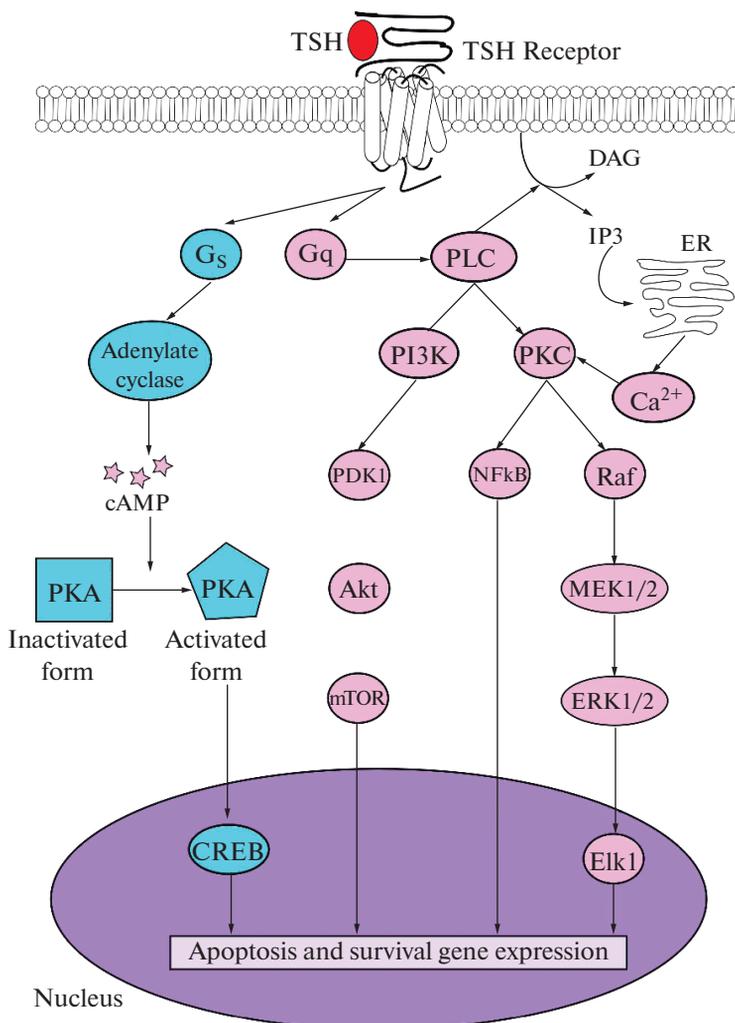
При этом важную роль играет изменение взаимной ориентации ТМН, в первую очередь ТМН6 [29, 38]. Так, для перехода в активированную конформацию наиболее важны гидрофобные взаимодействия между ТМН3, ТМН5 и ТМН6, что обеспечивает сдвиг ТМН6 кнаружи и более эффективное вовлечение интерфейсов между этой спиралью и третьей цитоплазматической петлей рецептора во взаимодействие с G-белками [39]. Определенный вклад в стабилизацию активированной конформации рецептора ТТГ вносят и гидрофильные контакты между внутренними поверхностями ТМН2, ТМН3, ТМН6 и ТМН7. Связывание рецептора с ТТГ приводит к изменению эффективности взаимодействий между гидрофильными группами аминокислотных остатков внутри трансмембранного канала, что, в свою очередь, меняет его конфигурацию и повышает способность функционально взаимодействовать с C-концевыми участками  $\alpha$ -субъединиц G-белков, проникающих в этот канал с цитоплазматической его стороны [40].

### СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА

Рецептор ТТГ может быть активирован не только ТТГ, но также тиреостимулином [41], стимулирующими аутоантителами к рецептору ТТГ, а также трипсином, который расщепляет рецепторную молекулу, удаляя эктодомен, ингибирующий его базальную активность [42]. Наряду с этим к перманентной активации рецептора ТТГ приводят мутации в различных его локусах и делеции в области внеклеточного домена [43]. Активация рецептора ТТГ способствует его функциональному взаимодействию с различными типами гетеротримерных G-белков, относящихся к  $G_s$ -,  $G_{i/o}$ - и  $G_{q/11}$ -семействам, а также с регуляторными белками  $\beta$ -аррестинами [44] (рис. 1).

“Классическим” сигнальным путем, который запускается в результате гормональной активации рецептора ТТГ, является цАМФ-зависимый путь, который включает  $G_s$ -белок и фермент аденилатциклазу, катализирующий образование вторичного посредника – цАМФ [43] (рис. 1). Повышение внутриклеточной концентрации цАМФ приводит к активации протеинкиназы А и фосфорилированию мишеней этой киназы, в первую очередь транскрипционного фактора, который специфично связывается с цАМФ-респонсивными элементами в промоторных участках генов (cAMP response element-binding protein, CREB). Именно через активацию фактора CREB реализуются эффекты ТТГ на синтез тиреоидных гормонов, а также эффекты на рост и дифференцировку клеток-мишеней [45]. При длительном повышении уровня цАМФ активируются сигнальные каскады, опосредующие ослабление цАМФ-зависимых сигнальных путей, и один из них опосредован активацией  $G_{i/o}$ -белков и ингибированием ТТГ-индуцированной активности аденилатциклазы [29].

Активация рецептора ТТГ через посредство  $G_{q/11}$ -белков может приводить к активации фосфоинозитид-специфичной фосфолипазы С $\beta$  (ФЛС $\beta$ ) и, как следствие, к запуску кальций-зависимых и 3-фосфоинозитидных каскадов, опосредующих широкий спектр метаболических и ростовых процессов [29, 46] (рис. 1). Активация ФЛС $\beta$  приводит к усилению продукции инозитол-1,4,5-трифосфата, опосредующего выход ионов кальция из внутриклеточных депо и активацию кальций-зависимых белков и транскрипционных факторов, а также диацилглицерина, активатора форбол-чувствительных изоформ протеинкиназы С и каскада митоген-активируемых протеинкиназ. В результате реализуется широкий спектр регуляторных влияний на рост и дифференцировку клеток, а также контролируются ключевые этапы синтеза тиреоидных гормонов [47]. Следствием активации ФЛС $\beta$  также является активация фосфатидинозитол-3-киназы (ФИЗК) – фермента, катализирующего синтез фосфатидинозитол-3,4,5-трифосфата. Это, в свою очередь, вы-



**Рис. 1.** Сигнальные пути тиреотропного гормона в тироцитах (по [48] с изменениями).

Условные обозначения: ТТГ – тиреотропный гормон; ФЛС – фосфоинозитид-специфичная фосфолипаза β; ФИЗК – фосфатидилинозитол-3-киназа; ПКС – кальций-чувствительная изоформа протеинкиназы С; цАМФ – циклический АМФ; PKA – цАМФ-активируемая серин/треониновая протеинкиназа А; CREB – транскрипционный фактор, взаимодействующий с цАМФ-респонсивным элементом; PDK1 – фосфоинозитид-зависимая киназа-1; Akt – серин/треониновая протеинкиназа В; mTOR – чувствительная к рапамицину киназа, кодируемая геном *MTOR* (*mammalian target of rapamycin*), относящаяся к семейству ФИЗК-подобных киназ; NFκB – ядерный фактор κB; Raf – протоонкогенная серин/треониновая протеинкиназа, относящаяся к семейству митоген-активируемых протеинкиназ, продукт гена *Raf1*, которая фосфорилирует киназу MEK1/2; MEK1/2 – киназа митогенактивируемых протеинкиназ, которая фосфорилирует киназу ERK1/2; ERK1/2 – терминальная киназа в каскаде митогенактивируемых протеинкиназ, регулируемая внеклеточными сигналами; Elk1 – кодируемый геном *Elk1* фактор тройного комплекса, функционирующий как активатор транскрипции.

зывает стимуляцию активности другого нижележащего фермента – серин/треониновой протеинкиназы В (Akt-киназу), мишенями которой является большое число ферментов и транскрипционных факторов, регулирующих транскрипцию множества генов, контролирующих апоптоз и выживаемость клеток [46].

Как отмечалось выше, рецептор ТТГ может быть переведен в конститутивно активированное состояние путем замены ряда аминокислот с помощью сайт-направленного мутагенеза, причем в большинстве своем эти аминокислоты локализованы в трансмембранном домене [49]. В настоящее время обнаружены или генерированы следующие активирующие мутации, затрагивающие аминокислотные остатки, локализованные в ТМН1, ТМН2, ТМН3, ТМН6 и ТМН7: V421I (ТМН1), Y466A (ТМН2), T501A (ТМН3), L587V (ТМН6), M637C (ТМН6), M637W (ТМН6), S641A (ТМН6), Y643F (ТМН6), L645V (ТМН6) и Y667A (ТМН7). Среди них наибольшее активирующее влияние оказывает мутация M637W (ТМН6), поскольку она в наибольшей степени меняет пространственную конфигурацию трансмембранного канала, повышая эффективность взаимодействия мутантного рецептора с G-белками.

Все эти остатки в той или иной степени участвуют в формировании аллостерического сайта рецептора ТТГ, расположенного внутри его трансмембранного домена [49]. В этой связи следует отметить, что в большинстве GPCR высокоаффинный ортостерический сайт локализован либо внутри трансмембранного домена, либо в области внеклеточного входа в трансмембранный канал, в то время как низкоаффинные аллостерические сайты расположены во внеклеточных петлях рецептора. Однако в рецепторах ТТГ и гонадотропинов, которые связываются со значительными по размеру гипофизарными гликопротеиновыми гормонами, ситуация обратная, и место ортостерического сайта в трансмембранном домене занимает аллостерический сайт, в то время как ортостерический сайт вынесен во внеклеточный домен. Тем самым, в рецепторе ТТГ имеется еще один очень важный регуляторный сайт, который расположен внутри трансмембранного домена, остается свободным в случае активации рецептора гормоном (точнее, содержит связанную воду и простые ионы и может стать одной из мишеней для регуляции активности ТТГ-зависимых путей, причем как позитивной (аллостерические агонисты), так и негативной (инверсионные агонисты, нейтральные антагонисты) [50].

## АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ РЕЦЕПТОРА ТТГ С АКТИВНОСТЬЮ АГОНИСТОВ И АНТАГОНИСТОВ

Функциональная важность рецептора ТТГ в гормональной регуляции функций ЩЖ указывает на то, что этот рецептор может стать одной из перспективных мишеней для фармакологических препаратов, предназначенных для лечения тиреоидной патологии. Среди критериев, которым должен удовлетворять такой препарат, особенно при лечении аутоиммунного гипертиреоза, могут быть выделены минимально выраженные побочные эффекты, сохранение нормальной функции ЩЖ, безопасность в отношении беременности и лактации, действие на уровне патогенеза, а также экономическая целесообразность. Препараты ТТГ в настоящее время в медицине практически не используются, поскольку не удовлетворяют большинству из приведенных выше критериев. В то же время большие перспективы связывают с регуляторами аллостерического сайта рецептора ТТГ. Здесь необходимо отметить, что сходная стратегия применяется и для поиска новых регуляторов и модуляторов рецепторов гонадотропинов, хотя в этом случае имеются препараты гонадотропинов, которые на протяжении многих лет используются в клинике при лечении репродуктивных дисфункций и во вспомогательных репродуктивных технологиях [51].

Неоспоримым преимуществом аллостерических регуляторов рецептора ТТГ является то, что они не взаимодействуют с внеклеточным ортостерическим сайтом, что не препятствует связыванию с рецептором эндогенного ТТГ. Наряду с этим, в зависимости от их структуры и особенностей взаимодействия с аллостерическим сайтом рецептора ТТГ, лиганды аллостерического сайта могут проявлять активность не только полных агонистов, как ТТГ, но и инверсионных агонистов и антагонистов, чему нет аналогов среди биогенных регуляторов. В случае лечения тиреоидной патологии востребованы лиганды аллостерического сайта рецептора ТТГ с различной активностью. Полные агонисты могут быть использованы для коррекции гипотиреоза и стимуляции закачки радиоактивного йода в тироциты при лечении рака ЩЖ. В настоящее время для повышения поглощения радиоактивного йода используют ТТГ, но это сопряжено с рядом нежелательных эффектов. В свою очередь, аллостерические инверсионные агонисты полезны для компенсации аутоиммунного гипертиреоза и офтальмопатии Грейвса, основной причиной которых являются циркулирующие в крови стимулирующие аутоантитела к рецептору ТТГ, а аллостерические нейтральные антагонисты полезны при лечении ТТГ-зависимых опухолей, в том числе нетиреоидной локализации. Важно, что обладающие активностью инверсионных агонистов и антагонистов аллостерические регуляторы рецептора ТТГ действуют мягко и лишь частично подавляют синтез тиреоидных гормонов, что предотвращает развитие острых гипотиреоидных состояний [52–54].

Однако имеется и ряд проблем при разработке аллостерических регуляторов рецептора ТТГ, среди которых наиболее существенной является их потенциальная способность взаимодействовать с трансмембранными аллостерическими сайтами рецепторов гонадотропинов, в первую очередь рецептора ЛГ, очень близкого рецептору ТТГ по структуре своего аллостерического сайта [55]. Высокая консервативность первичной структуры и пространственной организации трансмембранных аллостерических сайтов рецепторов ТТГ и гонадотропинов обусловлена тем, что мутационная изменчивость была характерна почти исключительно для эктодомена рецептора, определяющего его специфическое взаимодействие с различными изоформами гипофизарных гормонов, а также для цитоплазматических участков, вовлеченных в сопряжение с различными трансдукторными и регуляторными белками. В то же время механизм передачи сигнала к G-белкам, за который в основном отвечает трансмембранный домен, сохранялся неизменным, что и привело к эволюционной стабильности локализованного в нем аллостерического сайта [56]. Однако несмотря на структурное сходство, между аллостерическими сайтами рецепторов ТТГ и гонадотропинов имеются некоторые различия, которые могут быть использованы для создания селективных регуляторов этих сайтов. Так, трансмембранный аллостерический сайт рецептора ТТГ в отличие от наиболее близкого ему аллостерического сайта рецептора ЛГ меньше по объему и характеризуется большим числом гидрофобных аминокислотных остатков, в том числе на внешнем входе в сайт [55]. В связи с этим более гидрофильные низкомолекулярные аллостерические регуляторы рецептора ЛГ с низкой эффективностью проникают в аллостерический сайт рецептора ТТГ и имеют низкие константы связывания с ним. Так, разработанное в 2019 г. относительно гидрофобное соединение S37 с активностью аллостерического инверсионного агониста рецептора ТТГ, имеющее жесткую каркасную структуру, подавляет стимуляцию рецептора ТТГ как гормоном, так и стимулирующими антителами, но не влияет на функциональную активность рецепторов ЛГ и ФСГ [57]. Созданные нами тиенопиримидиновые производные с активностью агонистов и инверсионных антагонистов рецептора ТТГ также не влияли на активность рецептора ЛГ, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [11, 52, 58, 59]. При этом по гидрофобности они существенно превосходили соответствующие производные с активностью агонистов рецептора ЛГ и имели меньший объем бо-

**Таблица 1.** Аллостерические регуляторы рецептора ТТГ с активностью полных и инверсионных агонистов и нейтральных антагонистов

№	Название, формула	Биологическая активность	Источник
Полные агонисты			
1	Org41841 <i>N</i> - <i>трет</i> -бутил-5-амино-4-(3-метокси-фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3- <i>d</i> ]пиримидин-6-карбоксамид	Активация рецептора ТТГ и его сигнальных путей, повышение уровня цАМФ в клетках-мишенях	[55]
2	NCGC00168126-01 <i>N</i> -(4-(5-(3-(фуран-2-илметил)-4-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-2-ил)-2-метоксибензилокси)фенил)ацетамид		[60]
3	NCGC00161870-01 <i>N</i> -(4-(5-(3-бензил-5-гидрокси-4-оксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-2-ил)-2-метоксибензилокси)фенил)ацетамид		[60]
Инверсионные агонисты			
4	NCGC00229600 2-{3-[(2,6-диметилфенокси)метил]-4-метоксифенил}-3-(пиридин-3-илметил)-2,3-дигидрохиназолин-4(1H)-1	Ингибирование как конститутивной, так и стимулированной гормоном или аутоантителами активности рецептора ТТГ	[53]
5	NCGC00161856 2-{3-[(2,6-диметилфенокси)метил]-4-метоксифенил}-3-(фуран-2-илметил)-1,2-дигидрохиназолин-4(1H)-1		[61]
Нейтральные антагонисты			
6	NIDDK/CEB-52 5-амино-4-(4-бромфенил)- <i>N</i> - <i>трет</i> -бутил-2-(метилтио)тиено[2,3- <i>d</i> ]пиримидин-6-карбоксамид	Подавление активации рецептора ТТГ как ТТГ, так и стимулирующими аутоантителами при отсутствии влияния на базальную активность рецептора	[62]
7	NCGC00242595 2-{3-[(2,6-диметилфенилтио)метил]-4-метоксифенил}-3-(фуран-2-илметил)-2,3-дигидрохиназолин-4(1H)-1		[61]

ковых радикалов, что полностью удовлетворяло структурным характеристикам аллостерического сайта рецептора ТТГ [11, 59].

Результаты докинга низкомолекулярных соединений, наделенных активностью *in vitro* и *in vivo* в отношении рецептора ТТГ, в аллостерический сайт рецептора указывают на то, что эти соединения взаимодействуют преимущественно с теми аминокислотными остатками, локализованными в трансмембранном аллостерическом сайте рецептора, замены которых в наибольшей степени влияют на его специфическую активность. При этом важной является эффекторная специфичность аллостерических регуляторов, поскольку они активируют или, напротив, ингибируют какие-то определенные сигнальные каскады, осуществляемые через конкретный тип G-белка или  $\beta$ -аррестина. Это позволяет создавать эффектор-специфичные регуляторы рецептора ТТГ, которые в отличие от самого гормона направленно запускают определенный внутриклеточный сигнальный каскад и потому реализует вполне определенный биологический эффект.

В настоящее время разработаны как полные агонисты рецептора ТТГ, так и инверсионные агонисты и нейтральные антагонисты (табл. 1).

Первыми разработанными и продемонстрировавшими эффективность соединениями с активностью аллостерических агонистов рецептора ТТГ стали тиенопиримидиновые производные Org41841 и Org43553, известные также как полные агонисты рецептора ЛГ [63]. Было показано, что они обладают биологическим эффектом и в отношении рецептора ТТГ, хотя и в существенно меньшей степени. На основании данных о ключевых взаимодействиях этих аллостерических регуляторов и рецептора ТТГ с помощью методов молекулярного моделирования была сконструирована первая модель трансмембранного домена рецептора ТТГ [55], которая позволила в дальнейшем разрабатывать новые низкомолекулярные лиганды этого рецептора. Так, было разработано соединение NCGC00168126–01 и его более активный аналог NCGC00161870–01, оба характеризовались высокой селективностью по отношению к рецептору ТТГ и обладали способностью стимулировать активность рецептора в отсутствие ТТГ и стимулирующих антител [50, 60].

Дальнейшие исследования были направлены на поиск соединений, обладающих активностью нейтральных антагонистов и инверсионных агонистов. Так, в 2008 г. было разработано соединение NIDDK/СЕВ-52, ингибирующее стимулированную гормоном и аутоантителами активность рецептора ТТГ, что позволило его классифицировать как нейтральный антагонист [62]. Впоследствии были синтезированы соединения NCGC00242595 и NCGC00242364, обладающие выраженной антагонистической активностью в отношении рецептора ТТГ [53, 64], а также соединение s37a, которое подавляло стимуляцию рецептора не только ТТГ, но и олигоклональными антителами, характерными для болезни Грейвса [57].

На основании структуры NCGC00165237–01 были разработаны инверсионные агонисты NCGC00161856 [65] и NCGC00229600 [50], которые подавляли как стимулированную, так и базальную активность рецептора ТТГ. Это было важно для подавления роста опухолей, причиной которых являются активирующие мутации в молекуле рецептора ТТГ, приводящие к его высокой конститутивной активности и неспособности стимулироваться эндогенным ТТГ.

Нами на протяжении последних нескольких лет были разработаны соединения с активностью различных аллостерических регуляторов рецептора ТТГ. Соединение 5-амино-*N*-(*m*ре*m*-бутил)-4-(4-йодофенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]-пиримидин-6-карбоксамид (ТР48) характеризовалось активностью инверсионного агониста [58]. Оно снижало стимулированную ТТГ продукцию тиреоидных гормонов в культуре фолликулярных клеток ЩЖ крыс линии Fisher (FRTL-5) и базальные уровни тиреоидных гормонов при внутрибрюшинном введении препарата самцам крыс в дозе 15 мг/кг. При введении соединения ТР48 крысам за полчаса до обработки интраназально вводимым тиролиберином, рилизинг-фактором ТТГ, оно ингибировало стимулированное тиролиберином повышение уровней тироксина и трийодтиронина и подавляло стимулированную тиролиберином экспрессию генов *Tg*, *TPO* и *Dio2*, кодирующих основные белки синтеза тиреоидных гормонов в тиреоцитах – тиреоглобулин, основной источник тирозина для синтеза тиреоидных гормонов, тиреопероксидазу, осуществляющую йодирование тирозина и его конденсацию молекул йодтирозина в тироксин, и D2-дейодиназу, осуществляющую конверсию тироксина в трийодтиронин, эффекторный гормон тиреоидной системы.

Соединение 5-амино-*N*-(*m*ре*m*-бутил)-4-(4-(3-метоксипроп-1-ин-1-ил)фенил)-2-(метио)тиено[2,3-*d*]-пиримидин-6-карбоксамид (ТРУ1) было сходно с ТР48 по способности подавлять стимулированные ТТГ синтез тиреоидных гормонов и экспрессию тиреоидогенных белков в клетках FRTL-5, а также ингибировать стимулирующие эффекты тиролиберина на продукцию тироксина и трийодтиронина при введении самцам крыс [59, 66]. Однако соединение ТРУ1 не влияло на базальные уровни тиреоидных гормонов и на экспрессию тиреоидогенных генов в ЩЖ крыс без обработки тиролиберином. Все вышесказанное свидетельствует о том,

что ТРУ1 наделено активностью нейтрального антагониста, препятствующего стимуляции рецептора ТТГ гормоном, но не влияющего на собственную активность этого рецептора.

Соединение этил-2-(4-(4-(5-амино-6-(*m*р*em*-бутилкарбамоил)-2-(метилтио)тиено[2,3-*d*]-пиримидин-4-ил)фенил)-1*H*-1,2,3-триазол-1-ил)ацетат (ТРУ3*m*) продемонстрировало активность полного агониста рецептора ТТГ, наделенного тиреоидогенной активностью [11]. При введении самцам крыс (15 мг/кг, внутривенно) соединение ТРУ3*m* мягко стимулировало базальные уровни гормонов ЩЖ и повышало экспрессию генов *Tg*, *TPO* и *Dio2*. Предварительное введение ТРУ3*m* крысам усиливало стимулирующее воздействие тиролиберина на уровень тиреоидных гормонов и экспрессию генов *TPO* и *Dio2*, а также усиливало стимулирующий эффект тиролиберина на экспрессию гена *NIS*, кодирующего натрий-йодидный симпортер, ответственный за поглощение йодида фолликулярными клетками ЩЖ. Существенный вклад в стимулирующий эффект ТРУ3*m* может вносить и вызываемое им повышение экспрессии гена *Tshr*, кодирующего рецептор ТТГ, в ЩЖ контрольных и обработанных тиролиберинем крыс [11].

Наряду с аллостерическими регуляторами, взаимодействующими с трансмембранным аллостерическим сайтом, многообещающей является разработка лигандов аллостерических сайтов, локализованных в цитоплазматических петлях рецептора ТТГ, в первую очередь в его второй и третьей цитоплазматических петлях, содержащих ключевые молекулярные детерминанты, ответственные за взаимодействие с G-белками. В этом отношении перспективными являются пальмитоилированные пептидные фрагменты третьей цитоплазматической петли рецептора ТТГ, которые способны в отсутствие ТТГ стимулировать активность рецептора, меняя конформацию его цитоплазматических аллостерических сайтов и модулировать тем самым взаимодействие рецептора с G-белками [67–69].

### ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ РЕЦЕПТОРА ТТГ

Среди возможных механизмов ингибирующего влияния аллостерических антагонистов/инверсионных агонистов рецептора ТТГ предлагается два возможных молекулярных механизма (рис. 2). Первый состоит в вызываемой аллостерическим лигандом стабилизации “ионного замка”, который представляет собой полярное взаимодействие между положительно заряженным остатком аргинина, расположенного на границе ТМН3 и второй цитоплазматической петли, и отрицательно заряженными остатками глутаминовой или аспарагиновой кислот, локализованными на границе ТМН6 и третьей цитоплазматической петли [64]. Основная функция “ионного замка” состоит в стабилизации неактивной конформации рецептора. Антагонист, стабилизируя “ионный замок”, препятствует конформационным изменениям, ведущим к активации рецептора ТТГ, что блокирует связывание ТТГ-связанного рецептора с G-белками [70]. При этом аллостерические полные агонисты рецептора ТТГ способны дестабилизировать “ионный замок”, индуцировать конформационные изменения, в первую очередь обусловленные изменением пространственной локализации ТМН6 в трансмембранном домене, и, тем самым, стимулировать передачу сигнала к внутриклеточным каскадам [71] (рис. 2).

Другим механизмом действия аллостерических антагонистов может быть механическое воспрепятствование нормальному движению шарнирной области внеклеточного домена рецептора ТТГ [57]. В этом случае антагонист, внедряясь между внеклеточными петлями рецептора, “замораживает” шарнирную область, не позволяя ей подвергаться конформационным перестройкам при связывании ТТГ или стимулирующих аутоантител с внеклеточным доменом. Однако учитывая, что ал-

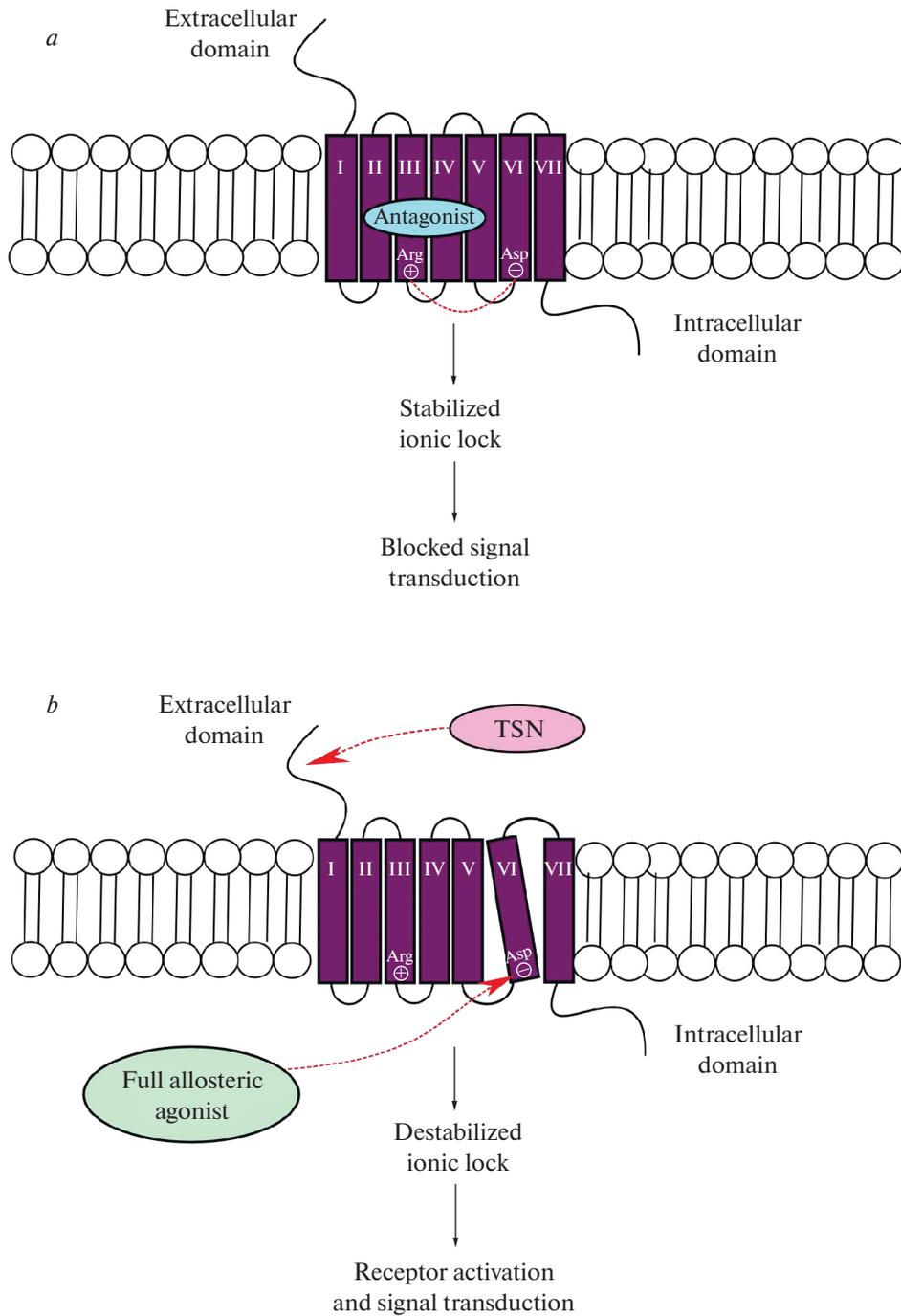


Рис. 2. Механизм функционирования "ионного замка" в рецепторе ТТГ (по [70] с изменениями).

лостерические регуляторы проникают внутрь трансмембранного домена рецептора ТТГ, не до конца понятно, как они могут непосредственно влиять на подвижность шарнирной области.

Нельзя исключить влияния аллостерических регуляторов на способность рецепторов ТТГ образовывать димерные и олигомерные комплексы, что самым непосредственным образом влияет на их активность и селективность передачи сигнала к внутриклеточным мишеням [70]. Такая возможность показана для рецептора ФСГ. Взаимодействие аллостерического регулятора с одним из мономеров олигомерного комплекса рецептора ФСГ приводит к ослаблению взаимодействия между мономерами и модифицирует способность рецепторных молекул взаимодействовать с гормоном [72].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные к настоящему времени экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о том, что рецептор ТТГ может рассматриваться как одна из важнейших мишеней для регуляции функций ЩЖ, контроля тиреоидного статуса и коррекции заболеваний, обусловленных гиперактивацией рецептора ТТГ (болезнь Грейвса, формы рака, обусловленные активирующими мутациями в рецепторе ТТГ) или снижением его активности (гипотиреоидные состояния). Парадоксально, но ТТГ и различные конструкторы на его основе не могут широко применяться для коррекции функций тиреоидной системы, что обусловлено их высокой иммуногенностью и серьезными побочными эффектами, в то время как разработка подходов для применения стимулирующих или ингибирующих аутоантител к рецептору ТТГ находится на начальном этапе, а ее возможное применение влечет за собой ряд нежелательных последствий, характерных для аутоиммунных заболеваний ЩЖ. В этой связи значительный интерес представляют низкомолекулярные аллостерические регуляторы рецептора ТТГ, которые могут быть наделены активностью как полных агонистов, так и инверсионных агонистов и антагонистов. Они взаимодействуют с аллостерическим сайтом, расположенным в трансмембранном домене, и не влияют на его связывание с гормоном или аутоантителами, которое осуществляется с помощью внеклеточных участков рецептора ТТГ. Создание аллостерических регуляторов позволяет более тонко и мягко регулировать активность рецептора ТТГ, не вызывая критических изменений уровня ТТГ и тиреоидных гормонов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-20122).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

Сбор литературы и написание текста обзора (Е.А.Ф.), концепция обзора и редактирование манускрипта (А.О.Ш.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vanderpump MPJ* (2019) Epidemiology of Thyroid Disorders. In: *The Thyroid and Its Diseases*. Springer Int Publ Cham, 75–85.

2. *Wémeau J, Klein M, Sadoul J-L, Briet C, Vélayoudom-Céphise F-L* (2018) Graves' disease: Introduction, epidemiology, endogenous and environmental pathogenic factors. *Ann Endocrinol* 79: 599–607.  
<https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.09.002>
3. *Burch HB, Cooper DS* (2018) Antithyroid drug therapy: 70 years later. *Eur J Endocrinol* 179: R261–R274.  
<https://doi.org/10.1530/EJE-18-0678>
4. *Vos XG, Endert E, Zwinderman AH, Tijssen JGP, Wiersinga WM* (2016) Predicting the Risk of Recurrence Before the Start of Antithyroid Drug Therapy in Patients With Graves' Hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metabolism* 101: 1381–1389.  
<https://doi.org/10.1210/jc.2015-3644>
5. *Walter MA, Briel M, Christ-Crain M, Bonnema SJ, Connell J, Cooper DS, Bucher HC, Müller-Brand J, Müller B* (2007) Effects of antithyroid drugs on radioiodine treatment: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 334: 514.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.39114.670150.BE>
6. *Bartalena L, Piantanida E, Gallo D, Ippolito S, Tanda ML* (2022) Management of Graves' hyperthyroidism: present and future. *Exp Rev Endocrinol Metabol* 17: 153–166.  
<https://doi.org/10.1080/17446651.2022.2052044>
7. *Furmaniak J, Sanders J, Sanders P, Li Y, Rees Smith B* (2022) TSH receptor specific monoclonal autoantibody K1-70<sup>TM</sup> targeting of the TSH receptor in subjects with Graves' disease and Graves' orbitopathy—Results from a phase I clinical trial. *Clin Endocrinol* 96: 878–887.  
<https://doi.org/10.1111/cen.14681>
8. *Garber JR, Cobin RH, Gharib H, Hennessey J V, Klein I, Mechanick JI, Pessah-Pollack R, Singer PA, Woeber KA* (2012) Clinical Practice Guidelines for Hypothyroidism in Adults: Cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Endocr Pract* 18: 988–1028.  
<https://doi.org/10.4158/EP12280.GL>
9. *Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, Burman KD, Cappola AR, Celi FS, Cooper DS, Kim BW, Peeters RP, Rosenthal MS, Sawka AM* (2014) Guidelines for the Treatment of Hypothyroidism: Prepared by the American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone Replacement. *Thyroid* 24: 1670–1751.  
<https://doi.org/10.1089/thy.2014.0028>
10. *Grover G, Mellstrom K, Malm J* (2007) Therapeutic Potential for Thyroid Hormone Receptor- $\alpha$  Selective Agonists for Treating Obesity, Hyperlipidemia and Diabetes. *Current Vasc Pharmacol* 5: 141–154.  
<https://doi.org/10.2174/157016107780368271>
11. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Fokina EA, Sorokoumov VN, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO* (2022) Development of Low-Molecular-Weight Allosteric Agonist of Thyroid-Stimulating Hormone Receptor with Thyroidogenic Activity. *Dokl Biochem Biophys* 503: 67–70.  
<https://doi.org/10.1134/S1607672922020016>
12. *Meruva S, Ayers SD, Winnier G, Webb P* (2013) Thyroid Hormone Analogues: Where Do We Stand in 2013? *Thyroid* 23: 1333–1344.  
<https://doi.org/10.1089/thy.2012.0458>
13. *Núñez Miguel R, Sanders J, Furmaniak J, Smith BR* (2017) Structure and activation of the TSH receptor transmembrane domain. *Autoimmun Highlights* 8: 2.  
<https://doi.org/10.1007/s13317-016-0090-1>
14. *Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE* (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Rev Drug Discov* 16: 829–842.  
<https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>
15. *Katritch V, Cherezov V, Stevens RC* (2013) Structure-Function of the G Protein-Coupled Receptor Superfamily. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 53: 531–556.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>
16. *Hsu SY, Hsueh AJW* (2000) Discovering New Hormones, Receptors, and Signaling Mediators in the Genomic Era. *Mol Endocrinol* 14:594–604.  
<https://doi.org/10.1210/mend.14.5.0472>
17. *Kaczur V, Puskás LG, Takács M, Rác IA, Szendrői A, Tóth S, Nagy Z, Szalai C, Balázs C, Falus A, Knudsen B, Farid NR* (2003) Evolution of the thyrotropin receptor: a G protein coupled receptor with an intrinsic capacity to dimerize. *Mol Genet Metabol* 78: 275–290.  
[https://doi.org/10.1016/S1096-7192\(03\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S1096-7192(03)00036-2)
18. *Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Jardón-Valadez E, Gutiérrez-Sagal R, Dias JA* (2018) Structure-Function Relationships of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor. *Front Endocrinol* 9.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00707>
19. *Ho SC, van Sande J, Lefort A, Vassart G, Costagliola S* (2001) Effects of Mutations Involving the Highly Conserved S281HCC Motif in the Extracellular Domain of the Thyrotropin (TSH) Receptor on TSH Binding and Constitutive Activity\*. *Endocrinology* 142: 2760–2767.  
<https://doi.org/10.1210/endo.142.7.8246>

20. *Mueller S, Jaeschke H, Günther R, Paschke R* (2010) The hinge region: an important receptor component for GPCR function. *Trends Endocrinol Metabol* 21: 111–122.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.09.001>
21. *Jiang X, Liu H, Chen X, Chen P-H, Fischer D, Sriraman V, Yu HN, Arkininstall S, He X* (2012) Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 12491–12496.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1206643109>
22. *Costagliola S* (2002) Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *The EMBO J* 21: 504–513.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/21.4.504>
23. *Schaarschmidt J, Huth S, Meier R, Paschke R, Jaeschke H* (2014) Influence of the Hinge Region and Its Adjacent Domains on Binding and Signaling Patterns of the Thyrotropin and Follitropin Receptor. *PLoS One* 9:e111570.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111570>
24. *Mueller S, Kleinau G, Jaeschke H, Paschke R, Krause G* (2008) Extended Hormone Binding Site of the Human Thyroid Stimulating Hormone Receptor. *J Biol Chem* 283: 18048–18055.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M800449200>
25. *Vlaeminck-Guillem V, Ho S-C, Rodien P, Vassart G, Costagliola S* (2002) Activation of the cAMP pathway by the TSH receptor involves switching of the ectodomain from a tethered inverse agonist to an agonist. *Mol Endocrinol* 16: 736–746.  
<https://doi.org/10.1210/mend.16.4.0816>
26. *Zhang M, Tong KP, Fremont V, Chen J, Narayan P, Puett D, Weintraub BD, Szkludlinski MW* (2000) The extracellular domain suppresses constitutive activity of the transmembrane domain of the human TSH receptor: implications for hormone-receptor interaction and antagonist design. *Endocrinology* 141: 3514–3517.  
<https://doi.org/10.1210/endo.141.9.7790>
27. *Mizutori Y, Chen C-R, McLachlan SM, Rapoport B* (2008) The Thyrotropin Receptor Hinge Region Is Not Simply a Scaffold for the Leucine-Rich Domain but Contributes to Ligand Binding and Signal Transduction. *Mol Endocrinol* 22: 1171–1182.  
<https://doi.org/10.1210/me.2007-0407>
28. *Brüser A, Schulz A, Rothemund S, Ricken A, Calebiro D, Kleinau G, Schöneberg T* (2016) The Activation Mechanism of Glycoprotein Hormone Receptors with Implications in the Cause and Therapy of Endocrine Diseases. *J Biol Chem* 291: 508–520.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701102>
29. *Kleinau G, Worth CL, Kreuchwig A, Biebermann H, Marcinkowski P, Scheerer P, Krause G* (2017) Structural–Functional Features of the Thyrotropin Receptor: A Class A G-Protein-Coupled Receptor at Work. *Front Endocrinol* 8:  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00086>
30. *Chen C-R, McLachlan SM, Rapoport B* (2009) A Monoclonal Antibody with Thyrotropin (TSH) Receptor Inverse Agonist and TSH Antagonist Activities Binds to the Receptor Hinge Region as Well as to the Leucine-Rich Domain. *Endocrinology* 150: 3401–3408.  
<https://doi.org/10.1210/en.2008-1800>
31. *Sun S, Summachiwakij S, Schneck O, Morshed SA, Ma R, Latif R, Davies TF* (2019) Antigenic “Hot-Spots” on the TSH Receptor Hinge Region. *Front Endocrinol* 9:  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00765>
32. *Kursawe R, Paschke R* (2007) Modulation of TSHR signaling by posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metabol* 18 199–207.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.05.002>
33. *Korta P, Pocheć E* (2019) Glycosylation of thyroid-stimulating hormone receptor. *Endokrynol Pol* 70: 86–100.  
<https://doi.org/10.5603/EP.a2018.0077>
34. *Nagayama Y, Nishihara E, Namba H, Yamashita S, Niwa M* (2000) Identification of the sites of asparagine-linked glycosylation on the human thyrotropin receptor and studies on their role in receptor function and expression. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 404–409.
35. *Ząbczyńska M, Kozłowska K, Pocheć E* (2018) Glycosylation in the Thyroid Gland: Vital Aspects of Glycoprotein Function in Thyrocyte Physiology and Thyroid Disorders. *Int J Mol Sci* 19: 2792.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19092792>
36. *Russo D, Chazenbalk GD, Nagayama Y, Wadsworth HL, Rapoport B* (1991) Site-Directed Mutagenesis of the Human Thyrotropin Receptor: Role of Asparagine-Linked Oligosaccharides in the Expression of a Functional Receptor. *Mol Endocrinol* 5: 29–33.  
<https://doi.org/10.1210/mend-5-1-29>
37. *Costanzi S, Wang K* (2014) The GPCR Crystallography Boom: Providing an Invaluable Source of Structural Information and Expanding the Scope of Homology Modeling. 3–13.
38. *Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Parndon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah STA, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK* (2011) Crystal structure of the  $\beta_2$  adrenergic recep-

- tor–Gs protein complex. *Nature* 477: 549–555.  
<https://doi.org/10.1038/nature10361>
39. *Karges B, Krause G, Homoki J, Debatin K-M, de Roux N, Karges W* (2005) TSH receptor mutation V509A causes familial hyperthyroidism by release of interhelical constraints between transmembrane helices TMH3 and TMH5. *J Endocrinol* 186: 377–385.  
<https://doi.org/10.1677/joe.1.06208>
  40. *Brüser A, Schulz A, Rothemund S, Ricken A, Calebiro D, Kleinau G, Schöneberg T* (2016) The Activation Mechanism of Glycoprotein Hormone Receptors with Implications in the Cause and Therapy of Endocrine Diseases. *J Biol Chem* 291: 508–520.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701102>
  41. *Nakabayashi K, Matsumi H, Bhalla A, Bae J, Mosselman S, Hsu SY, Hsueh AJW* (2002) Thyrostimulin, a heterodimer of two new human glycoprotein hormone subunits, activates the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 109: 1445–1452.  
<https://doi.org/10.1172/JCI14340>
  42. *van Sande J, Massart C, Costagliola S, Allgeier A, Cetani F, Vassart G, Dumont JE* (1996) Specific activation of the thyrotropin receptor by trypsin. *Mol Cell Endocrinol* 119: 161–168.  
[https://doi.org/10.1016/0303-7207\(96\)03804-X](https://doi.org/10.1016/0303-7207(96)03804-X)
  43. *Kleinau G, Krause G* (2009) Thyrotropin and Homologous Glycoprotein Hormone Receptors: Structural and Functional Aspects of Extracellular Signaling Mechanisms. *Endocr Rev* 30: 133–151.  
<https://doi.org/10.1210/er.2008-0044>
  44. *Eichel K, von Zastrow M* (2018) Subcellular Organization of GPCR Signaling. *Trends Pharmacol Sci* 39: 200–208.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.009>
  45. *Morshed SA, Latif R, Davies TF* (2009) Characterization of Thyrotropin Receptor Antibody-Induced Signaling Cascades. *Endocrinology* 150: 519–529.  
<https://doi.org/10.1210/en.2008-0878>
  46. *Hamm HE* (1998) The Many Faces of G Protein Signaling. *J Biol Chem* 273: 669–672.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.2.669>
  47. *Jang D, Marcus-Samuels B, Morgan SJ, Klubo-Gwiedzinska J, Neumann S, Gershengorn MC* (2020) Thyrotropin regulation of differentiated gene transcription in adult human thyrocytes in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 518: 111032.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111032>
  48. *Chu Y-D, Yeh C-T* (2020) The Molecular Function and Clinical Role of Thyroid Stimulating Hormone Receptor in Cancer Cells. *Cells* 9:1730.  
<https://doi.org/10.3390/cells9071730>
  49. *Hoyer I, Haas A-K, Kreuchwig A, Schülein R, Krause G* (2013) Molecular sampling of the allosteric binding pocket of the TSH receptor provides discriminative pharmacophores for antagonist and agonists. *Biochem Soc Transact* 41: 213–217.  
<https://doi.org/10.1042/BST20120319>
  50. *Neumann S, Gershengorn MC* (2011) Small molecule TSHR agonists and antagonists. *Ann d'Endocrinol* 72: 74–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.ando.2011.03.002>
  51. *Jungheim E, Meyer M, Broughton D* (2015) Best Practices for Controlled Ovarian Stimulation in *In Vitro* Fertilization. *Seminars Reproduct Med* 33: 077–082.  
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1546424>
  52. *Shpakov AO* (2021) Endogenous and Synthetic Regulators of the Peripheral Components of the Hypothalamo-Hypophyseal-Gonadal and -Thyroid Axes. *Neurosci Behav Physiol* 51: 332–345.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01076-4>
  53. *Turcu AF, Kumar S, Neumann S, Coenen M, Iyer S, Chiriboga P, Gershengorn MC, Bahn RS* (2013) A Small Molecule Antagonist Inhibits Thyrotropin Receptor Antibody-Induced Orbital Fibroblast Functions Involved in the Pathogenesis of Graves Ophthalmopathy. *The J Clin Endocrinol Metabol* 98: 2153–2159.  
<https://doi.org/10.1210/jc.2013-1149>
  54. *Krause G, Marcinkowski P* (2018) Intervention Strategies into Glycoprotein Hormone Receptors for Modulating (Mal-)function, with Special Emphasis on the TSH Receptor. *Hormone and Metabol Res* 50: 894–907.  
<https://doi.org/10.1055/a-0749-6528>
  55. *Jäschke H, Neumann S, Moore S, Thomas CJ, Colson A-O, Costanzi S, Kleinau G, Jiang J-K, Paschke R, Raaka BM, Krause G, Gershengorn MC* (2006) A Low Molecular Weight Agonist Signals by Binding to the Transmembrane Domain of Thyroid-stimulating Hormone Receptor (TSHR) and Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor (LHCGR). *J Biol Chem* 281: 9841–9844.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C600014200>
  56. *Knudsen B, Farid NR* (2004) Evolutionary divergence of thyrotropin receptor structure. *Mol Genetics and Metabol* 81: 322–334.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.01.010>

57. Marcinkowski P, Hoyer I, Specker E, Furkert J, Rutz C, Neuenschwander M, Sobottka S, Sun H, Nazare M, Berchner-Pfannschmidt U, von Kries JP, Eckstein A, Schülein R, Krause G (2019) A New Highly Thyrotropin Receptor-Selective Small-Molecule Antagonist with Potential for the Treatment of Graves' Orbitopathy. *Thyroid* 29: 111–123.  
<https://doi.org/10.1089/thy.2018.0349>
58. Derkach KV, Bakhtuykov AA, Sorokoumov VN, Shpakov AO (2020) New Thieno-[2,3-d]pyrimidine-Based Functional Antagonist for the Receptor of Thyroid Stimulating Hormone. *Dokl Biochem Biophys* 491: 77–80.  
<https://doi.org/10.1134/S1607672920020064>
59. Derkach KV, Fokina EA, Bakhtuykov AA, Sorokoumov VN, Steepochkina AM, Zakharova IO, Shpakov AO (2022) The Study of Biological Activity of a New Thieno[2,3-D]-Pyrimidine-Based Neutral Antagonist of Thyrotropin Receptor. *Bull Exp Biol Med* 172: 713–717.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-022-05462-x>
60. Neumann S, Huang W, Titus S, Krause G, Kleinau G, Alberobello AT, Zheng W, Southall NT, Inglese J, Austin CP, Celi FS, Gavrilo O, Thomas CJ, Raaka BM, Gershengorn MC (2009) Small-molecule agonists for the thyrotropin receptor stimulate thyroid function in human thyrocytes and mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12471–12476.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0904506106>
61. Boutin A, Allen MD, Geras-Raaka E, Huang W, Neumann S, Gershengorn MC (2011) Thyrotropin Receptor Stimulates Internalization-Independent Persistent Phosphoinositide Signaling. *Mol Pharmacol* 80: 240–246.  
<https://doi.org/10.1124/mol.111.072157>
62. Neumann S, Kleinau G, Costanzi S, Moore S, Jiang J, Raaka BM, Thomas CJ, Krause G, Gershengorn MC (2008) A Low-Molecular-Weight Antagonist for the Human Thyrotropin Receptor with Therapeutic Potential for Hyperthyroidism. *Endocrinology* 149: 5945–5950.  
<https://doi.org/10.1210/en.2008-0836>
63. Moore S, Jaeschke H, Kleinau G, Neumann S, Costanzi S, Jiang J, Childress J, Raaka BM, Colson A, Paschke R, Krause G, Thomas CJ, Gershengorn MC (2006) Evaluation of Small-Molecule Modulators of the Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin and Thyroid Stimulating Hormone Receptors: Structure–Activity Relationships and Selective Binding Patterns. *J Med Chem* 49: 3888–3896.  
<https://doi.org/10.1021/jm060247s>
64. Neumann S, Nir EA, Eliseeva E, Huang W, Marugan J, Xiao J, Dulcey AE, Gershengorn MC (2014) A selective TSH receptor antagonist inhibits stimulation of thyroid function in female mice. *Endocrinology* 155: 310–314.  
<https://doi.org/10.1210/en.2013-1835>
65. Neumann S, Huang W, Eliseeva E, Titus S, Thomas CJ, Gershengorn MC (2010) A Small Molecule Inverse Agonist for the Human Thyroid-Stimulating Hormone Receptor. *Endocrinology* 151: 3454–3459.  
<https://doi.org/10.1210/en.2010-0199>
66. Bakhtuykov A, Derkach K, Sorokoumov V, Fokina E, Shpakov A (2021) The development of new low-molecular-weight allosteric antagonists of thyroid-stimulating hormone receptor and their effect on the basal and thyroliberin-stimulated production of thyroid hormones. *FEBS Open Bio* 11: 103–107.  
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.13205>
67. Shpakova EA, Shpakov AO, Chistyakova OV, Moiseyuk IV, Derkach KV (2012) Biological activity in vitro and in vivo of peptides corresponding to the third intracellular loop of thyrotropin receptor. *Dokl Biochem Biophys* 443: 64–67.  
<https://doi.org/10.1134/S1607672912020020>
68. Shpakov AO, Shpakova EA, Tarasenko II, Derkach KV (2014) Peptide 612–627 of thyrotropin receptor and its modified analogs as regulators of adenylyl cyclase in rat thyroid gland. *Cell and Tissue Biol* 8: 488–498.  
<https://doi.org/10.1134/S1990519X1406008X>
69. Derkach KV, Shpakova EA, Titov AK, Shpakov AO (2015) Intranasal and Intramuscular Administration of Lysine-Palmitoylated Peptide 612–627 of Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Increases the Level of Thyroid Hormones in Rats. *Int J Peptide Res Therap* 21: 249–260.  
<https://doi.org/10.1007/s10989-014-9452-6>
70. Davies TF, Ali MR, Latif R (2014) Allosteric Modulators Hit the TSH Receptor. *Endocrinology* 155: 1–5.  
<https://doi.org/10.1210/en.2013-2079>
71. Audet M, Bouvier M (2012) Restructuring G-Protein- Coupled Receptor Activation. *Cell* 151: 14–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.003>
72. Nataraja S, Sriraman V, Palmer S (2018) Allosteric Regulation of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor. *Endocrinology* 159: 2704–2716.  
<https://doi.org/10.1210/en.2018-00317>

## Thyroid-Stimulating Hormone Receptor: Role in the Development of Thyroid Pathology and a Promising Target for Its Correction

E. F. Fokina<sup>a, \*</sup> and A. O. Shpakov<sup>a</sup>

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

*\*e-mail: fokina-katrina@yandex.ru*

One of the key components responsible for the thyroid gland's response to thyroid-stimulating hormone (TSH) stimulation is the TSH receptor, which belongs to the G-protein-coupled receptor superfamily. Binding of TSH or stimulatory autoantibodies to the extracellular domain of the TSH receptor triggers multiple signaling pathways in target cells that are mediated through various types of G-proteins and  $\beta$ -arrestins. Inhibitory autoantibodies, in contrast, suppress the activity of the TSH receptor, inducing hypothyroid states. Activating mutations lead to constitutively active forms of the TSH receptor and can trigger cancer. In accordance with this, the TSH receptor is one of the key targets for the regulation of thyroid function and thyroid status, as well as for the correction of diseases caused by changes in the activity of the TSH receptor (autoimmune hyperthyroidism and hypothyroidism, Graves' ophthalmopathy, thyroid cancer). TSH preparations are extremely rarely used in medicine, due to their immunogenicity and serious side effects. The greatest prospects are associated with the development of low-molecular-weight allosteric regulators of the TSH receptor with the activity of full and inverse agonists and neutral antagonists. They are able to penetrate into the allosteric site located in the transmembrane domain of the TSH receptor and bind specifically to it, thereby controlling the ability of the receptor to interact with G-proteins and  $\beta$ -arrestins. Allosteric regulators do not affect the binding of TSH and autoantibodies to the receptor, which creates opportunities for mild and selective regulation of thyroid function without critical changes in the level of TSH and thyroid hormones. The present review is devoted to the current state of the problem of regulating the activity of the TSH receptor, including with the possible use of ligands of its allosteric sites.

**Keywords:** thyrotropin receptor, thyroid stimulating hormone, allosteric regulator, thyroid gland, transmembrane domain, thyroid hormone, autoimmune hyperthyroidism

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ПТСР-ПОДОБНОГО  
ИЛИ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОГО СОСТОЯНИЯ САМЦОВ КРЫС  
ПЕРЕД СПАРИВАНИЕМ НА АКТИВНОСТЬ  
ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ  
ПОЛОВОЗРЕЛЫХ ПОТОМКОВ**

© 2022 г. Н. Э. Ордян<sup>1</sup>, \*, С. Г. Пивина<sup>1</sup>, Г. И. Холова<sup>1</sup>,  
В. К. Акулова<sup>1</sup>, В. В. Ракицкая<sup>1</sup>

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

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

Поступила в редакцию 26.05.2022 г.

После доработки 29.07.2022 г.

Принята к публикации 30.07.2022 г.

В настоящее время растет число наблюдений о трансгенерационном влиянии стресса отца на различные функции потомков без вовлечения прямого взаимодействия между потомками и отцом. Установлено, что у потомков родителей, страдавших посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР), наблюдается усиление ПТСР-подобных симптомов. В экспериментах, где у самцов мышей создавали хронически повышенный уровень кортикостерона в течение всего периода сперматогенеза, показано снижение стрессорной реактивности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС) у потомков обоего пола. Однако ПТСР у больших создает сниженный уровень глюкокортикоидов в крови, а экспериментальные данные о влиянии моделирования ПТСР у отцов на активность ГГАС потомков отсутствуют. В связи с этим цель исследования состояла в сравнении эффектов ПТСР-подобного состояния (парадигма “стресс–рестресс”) и депрессивно-подобного состояния (парадигма “выученная беспомощность”) самцов крыс перед спариванием на активность ГГАС их половозрелых потомков обоего пола. Помимо активности ГГАС у потомков анализировали экспрессию глюкокортикоидных рецепторов методом количественной иммуноцитохимии в гиппокампе и медиальной префронтальной коре (мПФК). Установлено, что у самок – потомков отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием – наблюдается снижение, базальной и стрессорной реактивности ГГАС в ответ на 30-минутную иммобилизацию, что сопровождалось увеличением экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и 2-ом слое мПФК. Схожий профиль активности ГГАС был выявлен и у самцов – потомков отцов с моделированием ПТСР. Однако у самцов – потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием – чувствительность ГГАС к сигналам обратной связи снижалась и сопровождалась уменьшением экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и 2-ом слое мПФК. Сделано заключение, что ПТСР- или депрессивно-подобное состояние отцов в период сперматогенеза оказывает дифференциальное влияние на активность ГГАС и экспрессию глюкокортикоидных рецепторов в мозге их потомков самцов.

*Ключевые слова:* “стресс–рестресс”, “выученная беспомощность”, отцовский стресс, ось гипоталамус–гипофиз–кора надпочечников, глюкокортикоидный рецептор, гиппокамп, медиальная префронтальная кора, потомки, крыса

DOI: 10.31857/S0869813922090114

В настоящее время растет число доклинических и эпидемиологических наблюдений о трансгенерационном влиянии стресса отца на различные функции потомков без вовлечения прямого взаимодействия между потомками и отцом. Эпидемиологические исследования родителей, страдавших посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР), продемонстрировали усиление ПТСР-подобных симптомов у их потомков, которые сами по себе никакие травматические события не испытывали [1]. Такие симптомы у потомков проявлялись прежде всего в снижении базального уровня кортикостерона и усилении чувствительности их гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС) к сигналам отрицательной обратной связи. Однако такой профиль активности ГГАС был характерен только для потомков обоих родителей, болевших ПТСР, но не отцов, потомки которых, напротив, демонстрировали признаки ослабления регуляции ГГАС по механизму отрицательной обратной связи [2].

В эксперименте на лабораторных животных также было установлено влияние стресса отца на активность ГГАС потомков. В исследованиях Rodgers с соавт. [3] было показано, что хроническое умеренное стрессирование самцов мышей, создающее повышенный уровень кортикостерона в течение всего периода сперматогенеза, проявляется у их половозрелых потомков обоего пола в снижении стрессорной реактивности ГГАС. Эти данные позволили авторам рассматривать стресс отца как фактор риска развития ПТСР у их потомков [4].

В наших исследованиях был установлен факт влияния ПТСР-подобного состояния самцов крыс в период сперматогенеза на активность ГГАС их половозрелых потомков [5]. Профиль активности этой системы со сниженным базальным уровнем кортикостерона и пониженной стрессореактивностью, а также ускоренным торможением после стрессорной активации в целом соответствует симптомам ПТСР у людей [6]. Тем не менее, использованная нами модель ПТСР “стресс–рестресс” создает сниженный уровень кортикостерона в крови, а не повышенный, как в упомянутом исследовании Rodgers и соавт. [3]. Возникает вопрос: сама ли по себе стрессорная процедура, предъявленная самцам-отцам, влияет на активность ГГАС потомков, или значение имеет тот уровень кортикостерона, который в крови самцов-отцов создается в период созревания сперматозоидов? Последнее представляет определенный интерес в связи с тем, что как повышенный, так и сниженный уровень глюкокортикоидов в крови может оказывать влияние на процесс сперматогенеза [7].

В связи с этим в настоящем исследовании мы сравнили эффекты ПТСР-подобного состояния (сниженный уровень кортикостерона) и депрессивно-подобного состояния (повышенный уровень кортикостерона) самцов-отцов перед спариванием на активность ГГАС их половозрелых потомков обоего пола.

Для моделирования ПТСР у самцов крыс мы использовали парадигму “стресс–рестресс”, в которой основным воздействием служит травматический комбинированный стресс с последующим дополнительным стрессированием (рестресс) через 6 сут, но более слабым и менее продолжительным. Рестресс служит триггером для развития стойкого ПТСР-подобного состояния, сопровождающееся снижением уровня кортикостерона и усилением чувствительности ГГАС к сигналам отрицательной обратной связи не менее 10 дней [8]. В качестве модели депрессии использовали парадигму “выученная беспомощность”, где самцов подвергали часовой электро-кожной стимуляции в режиме неизбежности и неконтролируемости [9]. Такое воздействие создает не только повышенный уровень кортикостерона в крови, но и нарушает регуляцию ГГАС по механизму отрицательной обратной связи на протяжении не менее 10 дней [10]. В обеих парадигмах по сути используется однократное сильное стрессорное воздействие, что позволяет дифференциально учитывать влияние уровня кортикостерона в крови самцов в процессе сперматогенеза

на активность ГГАС их половозрелых потомков. Помимо активности ГГАС у потомков мы также анализировали экспрессию глюкокортикоидных рецепторов методом количественной иммуноцитохимии в гиппокампе и медиальной префронтальной коре (мПФК) – структурах, имеющих непосредственное отношение к регуляции активности этой гормональной оси [11].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на животных из ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем”. В исследовании использовали 15 самцов крыс линии Вистар в возрасте 3 мес. и массой тела 250–280 г, 30 самок крыс той же линии в возрасте 3 мес. и массой 220–240 г. Были соблюдены все рекомендации по этике работы с животными, утвержденными правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Животных содержали в пластиковых клетках, по 6 особей, на стандартной диете (гранулированный комбикорм) при свободном доступе к воде и пище и 12-часовом режиме смены дня и ночи.

Самцов случайным образом делили на 3 группы по 5 крыс в каждой. У первой группы вырабатывали ПТСР-подобное состояние, для чего их подвергали комбинированному стрессорному воздействию, состоящему из двухчасовой иммобилизации в узких пластиковых пеналах, двадцатиминутного плавания в стеклянных цилиндрах диаметром 40 см и глубиной 60 см, заполненных водой с температурой  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , и после небольшой паузы эфирный стресс в течение 1 мин. Все типы стрессорных воздействий применяли последовательно. На 7-е сутки после комбинированного стресса производили тридцатиминутную иммобилизацию – рестресс.

Самцов второй группы подвергали неизбежаемому и неконтролируемому электрокожному раздражению в клетке с токопроводящим полом размером  $30 \times 18 \times 20$  см. Удары электрического тока (1 мА, 50 Гц) длительностью 15 с подавались 60 раз в течение 1 ч с длительностью интервала между ударами током от 15 до 54 с. Такой тип стрессорного воздействия формирует у животных состояние “выученная беспомощность”, являющееся моделью депрессии [9]. Самцы третьей группы оставались интактными и служили контролем для первой и второй групп.

В исследованиях, проведенных нами ранее, было установлено, что в парадигме “стресс–рестресс” не все самцы формируют ПТСР-подобное состояние со сниженным уровнем кортикостерона на 10-е сутки после рестресса [5]. В связи с этим у самцов на 10-е сутки после “рестресса” или электрокожного раздражения, а также у контрольных самцов в покое осуществляли забор проб крови из хвостовой вены, которую использовали для определения уровня кортикостерона в крови. Полученные пробы крови центрифугировали (1000 g, 20 мин,  $4^\circ\text{C}$ ) и далее плазму хранили при температуре  $-20^\circ\text{C}$ .

Самцов через 46–48 сут после процедуры стрессирования, а также контрольных самцов по одиночке подсаживали к двум рецептивным самкам, находящимся в стадии проэструс–эструс. На следующий день у самок забирали вагинальные мазки с целью обнаружения в них сперматозоидов. Если сперматозоиды обнаружены не были, то самец оставался с самкой еще на один эстральный цикл.

Беременных самок отсаживали от самцов и содержали по 5 особей в клетке до 17-го дня беременности, а с 18-го дня – в индивидуальных клетках. На 2-е сутки после родов пометы выравнивали (не более 8 крысят с равным соотношением полов). Пометы содержали с матерью до 30-дневного возраста, а далее по 6–7 особей в соответствии с полом. От каждого самца было получено по два помета.

Дальнейшие эксперименты выполняли на половозрелых потомках (возраст 2.5 мес., масса 220–250 г – самцы и 200–230 г – самки) трех групп самцов. Экспериментальные группы формировали таким образом, чтобы в каждой группе присутствовало не более двух животных соответствующего пола из одного помета.

Активность ГГАС половозрелых потомков исследовали по изменению содержания кортикостерона в плазме крови в динамике до и после иммобилизационного стрессорного воздействия. Каждую крысу помещали в узкий пластиковый пенал, ограничивающий подвижность, и в течение не более 3 мин из хвостовой вены отбирали пробу крови (0 мин, базальная активность). Далее через 30 мин повторяли отбор крови (30 мин, стрессорная активность ГГАС). Затем крысу из пенала извлекали, помещали в домашнюю клетку, а через 180 мин кровь из хвостовой вены отбирали вновь (торможение ГГАС после стрессорной активации). Полученные пробы крови центрифугировали (1000 g, 20 мин, 4°C) и далее плазму хранили при температуре –20°C до момента определения содержания в ней кортикостерона.

Оценку активности ГГАС проводили с 11-00 до 14-00 ч. Каждая группа контрольных и подопытных крыс состояла из 10 животных соответствующего пола.

Уровень кортикостерона в плазме крови определяли методом ИФА, используя стандартные наборы производства “ХЕМА” (Россия) и анализатор Multiskan FS (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Анализ выполнялся согласно протоколу производителя.

Отдельную группу животных – потомков двух групп стрессированных самцов и контрольных животных – использовали для анализа экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в головном мозге. Животных декапитировали, мозг быстро извлекали из черепной коробки и помещали в 4%-ный раствор параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.3) на 1 ч, а затем на 48 ч при 4°C. Далее определение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов проводили по методике, описанной ранее [12]. Вкратце, материал после стандартной гистологической обработки заливали в парафин и изготавливали серии срезов мозга во фронтальной плоскости толщиной 6 мкм. Выявление иммунореактивного вещества проводили с помощью метода немеченых антител (авидин-биотинового) и иммунопероксидазной реакции. Использовали первичные кроличьи поликлональные антитела к глюкокортикоидным рецепторам (Abscam, ab3578, разведение 1 : 200) и стандартный набор АВС кит (Abscam, ab64261). Для визуализации реакции связывания антитела с антигеном использовали диаминобензидиновый комплекс, входящий в состав кита АВС. Количественную оценку иммунореактивности производили с использованием системы анализа изображения, включающей световой микроскоп Olympus CX31 (Япония), цветную цифровую камеру VideoZavr Standard VZ-C31Sg и программное обеспечение Видеозавр Мультиметр 2.3 (“АТМ-практика”, Санкт-Петербург). Проводили оценку средней оптической плотности окраски в иммунопозитивных нейронах гиппокампа и мПФК (1 мм от брегмы).

Подсчет производился на 4–5 срезах от каждого животного, было проанализировано количество клеток на одинаковой площади среза для каждой исследуемой области гиппокампа (поле СА1, зубчатая извилина) и мПФК (2-й и 5-й клеточные слои). На основании оценки оптической плотности иммунопозитивные клетки разделяли на 3 класса: слабо- (0.05–0.1 ед. оптической плотности), средне- (0.1–0.25 ед. оптической плотности) и сильноиммунореактивные (0.25–0.5 ед. оптической плотности) клетки. Проанализировали общее число иммунореактивных клеток и число клеток каждого класса.

Для оценки индекса общей иммунореактивности (ОИр) использовали формулу:

$$1 \times n(3 \text{ кл.}) + 2 \times n(2 \text{ кл.}) + 3 \times n(1 \text{ кл.}) = \text{ОИр},$$

где  $n$  – число клеток 1-го, 2-го и 3-го класса соответственно [13].

Каждая группа самцов и самок в данном эксперименте состояла из 6 животных.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 12.0. Оценку нормальности распределения данных проводили с использованием теста Шапиро–Уилка. Для анализа динамики стрессорной реактивности ГГАС применяли двухфакторный ANOVA для повторных измерений (группа (отец)  $\times$  уровень кортикостерона в зависимости от времени начала стрессирования) с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) значений уровня кортикостерона в каждой временной точке у отдельных групп животных. Уровень кортикостерона в крови самцов отцов и результаты иммуноцитохимического исследования анализировали с применением однофакторного ANOVA с последующими парными *post-hoc* сравнениями (тест Тьюки) значений для каждой группы животных. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ . Данные представлены в виде  $M \pm m$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

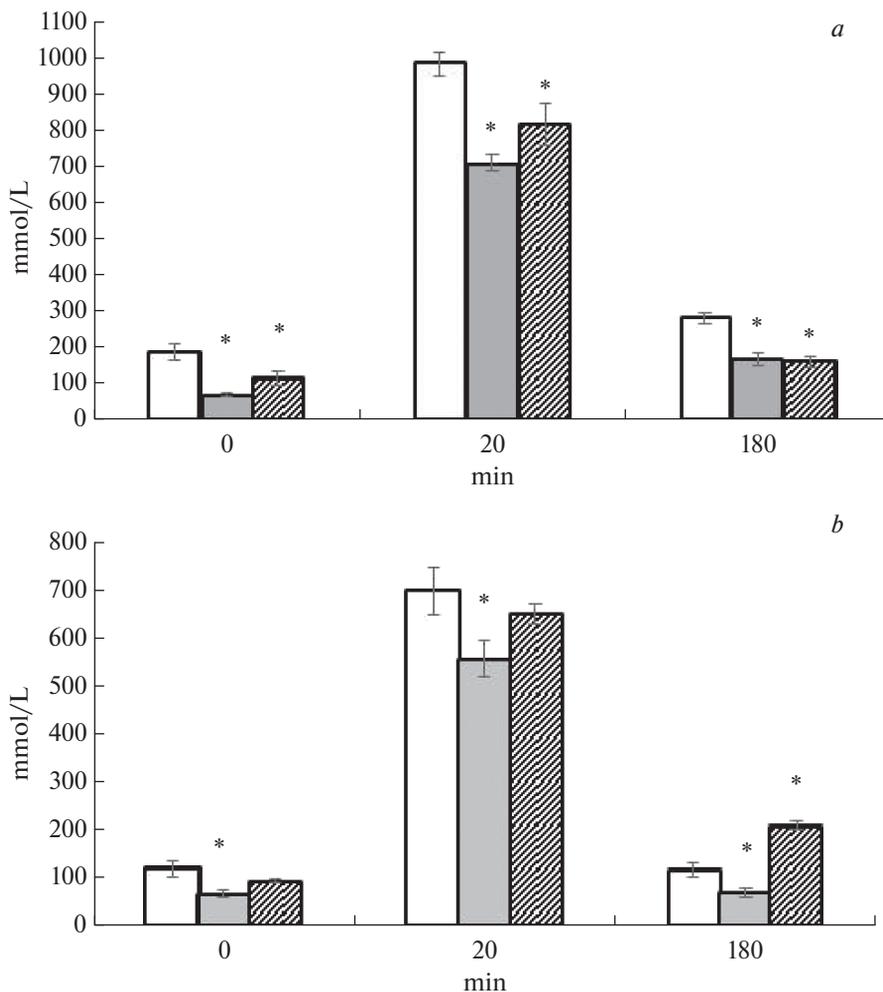
Проведенные исследования показали, что в выполненной серии экспериментов все самцы сформировали ПТСР-подобное состояние (сниженный базальный уровень кортикостерона,  $82.3 \pm 9.2$  нмоль/л) и депрессивно-подобное состояние (повышенный базальный уровень кортикостерона,  $188.7 \pm 15.4$  нмоль/л) по сравнению с группой контрольных самцов ( $134.1 \pm 12.2$ ,  $p < 0.05$ ).

Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние пола животных на динамику стрессорного выброса кортикостерона как в группе потомков контрольных самцов отцов ( $F_{(2,59)} = 7.3$ ,  $p < 0.001$ ), так и в группах потомков отцов с ПТСР-подобным ( $F_{(2,59)} = 7.9$ ,  $p < 0.01$ ) или депрессивно-подобным состоянием ( $F_{(2,59)} = 13.8$ ,  $p < 0.001$ ). Таким образом стресс отца не повлиял на характер активности ГГАС потомков в зависимости от пола.

Выявлено достоверное взаимодействие факторов отец и уровень кортикостерона в зависимости от времени начала стрессирования у потомков самцов ( $F_{(4,89)} = 6.8$ ,  $p < 0.01$ ) и потомков самок ( $F_{(4,89)} = 4.3$ ,  $p < 0.05$ ). *Post-hoc* анализ различий между группами в каждой временной точке показал, что у самок – потомков отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием – наблюдается снижение базальной и стрессорной реактивности ГГАС по сравнению с потомками контрольных самцов отцов (рис. 1а). Сходный характер активности ГГАС был выявлен и у самцов – потомков отцов с ПТСР-подобным состоянием (рис. 1б). Однако у самцов – потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием – изменений в базальной и стрессорной активности ГГАС не выявлено, тогда как чувствительность этой гормональной оси к сигналам обратной связи снижалась, о чем свидетельствовал более высокий уровень кортикостерона через 180 мин после начала 30-минутной иммобилизации по сравнению с потомками контрольных самцов отцов.

Результаты иммуногистохимического анализа экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и мПФК потомков представлены в табл. 1 и 2.

Самцы и самки – потомки отцов с моделированием ПТСР – характеризовались повышенной экспрессией глюкокортикоидных рецепторов в поле CA1 гиппокампа и зубчатой извилине, а также во 2-ом слое мПФК по сравнению с потомками контрольных самцов. Такие же изменения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и мПФК были выявлены и у самок – “потомков отцов с выученной беспомощностью”. Напротив, у самцов – потомков отцов с депрессивно-подобным состоянием (парадигма “выученная беспомощность”) обнаружено снижение экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в поле CA1 гиппокампа и тенденция к снижению в зубчатой извилине ( $p = 0.07$ ), а также статистически значимое снижение этого показателя во 2-ом слое мПФК. Изменений в

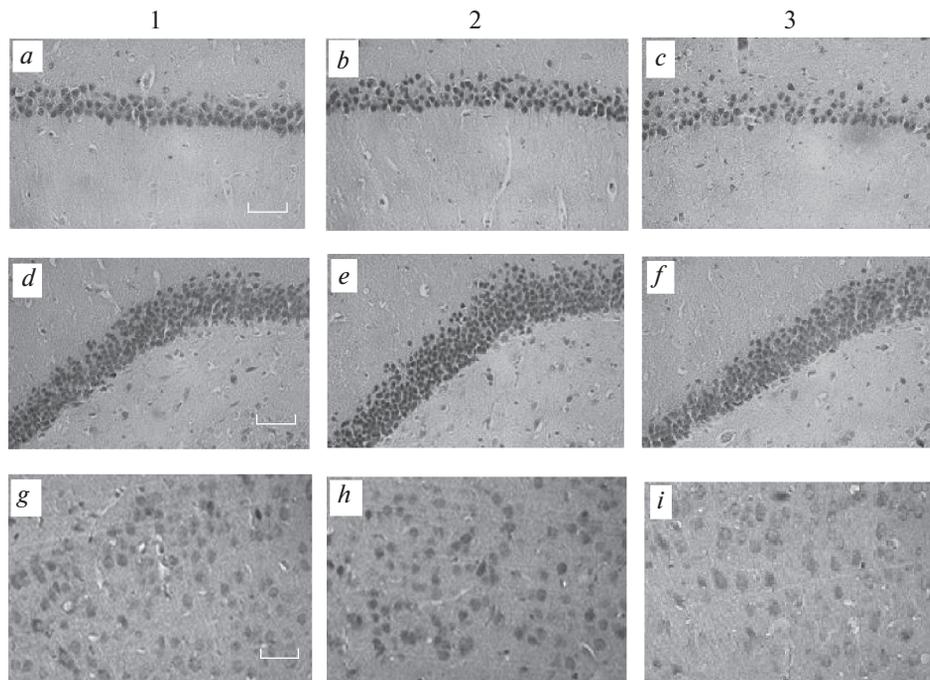


**Рис. 1.** Характер базальной и стрессорной активности ГГАС потомков самцов отцов с ПТСР-подобным или депрессивно-подобным состоянием. *a* – потомки самки; *b* – потомки самцы. По вертикали – уровень кортикостерона в плазме крови (нмоль/л), по горизонтали – время от начала 30-минутной иммобилизации. Белые столбики – потомки контрольных самцов отцов, темные столбики – потомки отцов с ПТСР-подобным состоянием, столбики со штриховкой – потомки отцов с депрессивно-подобным состоянием. \* – статистически значимые различия между потомками подопытных и контрольных самцов отцов ( $p < 0.05$ ).

экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в 5-ом слое мПФК не выявлено ни у одной из групп крыс. Микрофотографии областей мозга с выявленными клетками, экспрессирующими глюкокортикоидные рецепторы, у самцов – потомков отцов разных экспериментальных групп – представлены на рис. 2.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Внимание к роли ПТСР родителей как фактора риска развития ПТСР у их потомков было привлечено исследованием, проведенным Solomon и соавт. [14], по-



**Рис. 2.** Экспрессия белка глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и медиальной префронтальной коре самцов – потомков отцов экспериментальных групп. 1 – потомки контрольных самцов; 2 – потомки самцов с ПТСР-подобным состоянием; 3 – потомки самцов с депрессивно-подобным состоянием. *a, b, c* – СА1 поле гиппокампа; *d, e, f* – зубчатая извилина; *g, h, i* – медиальная префронтальная кора. Масштаб 50 мкм.

**Таблица 1.** Показатель индекса иммунореактивности к глюкокортикоидным рецепторам областей мозга потомков самок

Область мозга	Потомки контрольных самцов	Потомки самцов с ПТСР-подобным состоянием	Потомки самцов с депрессивно-подобным состоянием	Однофакторный ANOVA
СА1 поле гиппокампа	60.2 ± 3.2	80 ± 5.8*	74.6 ± 4.3**	$F_{(2,17)} = 7.8, p < 0.01$
Зубчатая извилина	220.7 ± 16.2	341.5 ± 18.9**	283.5 ± 15.8*	$F_{(2,17)} = 15.5, p < 0.0001$
2-й слой мПФК	194.3 ± 4.4	246.5 ± 9.6*	244 ± 10.9*	$F_{(2,17)} = 9.4, p < 0.001$
5-й слой мПФК	104.5 ± 6.7	127.3 ± 12.4	123.8 ± 11.2	$F_{(2,17)} = 3.56, p > 0.05$

\* – статистически значимые отличия от потомков контрольных самцов ( $p < 0.05$ ), \*\* –  $p < 0.01$ .

**Таблица 2.** Показатель индекса иммунореактивности к глюкокортикоидным рецепторам областей мозга потомков самцов

Область мозга	Потомки контрольных самцов	Потомки самцов с ПТСР-подобным состоянием	Потомки самцов с депрессивно-подобным состоянием	Однофакторный ANOVA
СА1 поле гиппокампа	64.2 ± 4.6	78 ± 6.8*	34.3 ± 4.4**	$F_{(2,17)} = 17.6, p < 0.0001$
Зубчатая извилина	253.7 ± 10.5	380 ± 21.3*	211.5 ± 22.2	$F_{(2,17)} = 13.2, p < 0.0001$
2-й слой мПФК	253.3 ± 12.2	352.2 ± 25.4*	206.7 ± 13.9*	$F_{(2,17)} = 21.4, p < 0.0001$
5-й мПФК	123.8 ± 4.2	148.5 ± 15.3	115 ± 6.3	$F_{(2,17)} = 3.4, p > 0.05$

\* – статистически значимые отличия от потомков контрольных самцов ( $p < 0.05$ ), \*\* –  $p < 0.01$ .

казавшими, что ветераны войны в Ливане, которые являлись потомками переживших Холокост, были более склонны к развитию ПТСР, чем другие израильские солдаты, после своего военного опыта. Это исследование предоставило первое эмпирическое доказательство большей чувствительности потомков родителей, переживших Холокост, к их собственным стрессовым событиям.

Более подробно данная проблема была разработана Yahuda с соавт., которые убедительно продемонстрировали, что у потомков, переживших травматические события, вероятность развития ПТСР была выше, если их родители болели этой психопатологией [15, 16]. Авторы пришли к выводу, что ПТСР у родителей может быть фактором риска развития соответствующего заболевания у потомков.

Дальнейшие исследования, проведенные коллективом этих авторов, выявили, что родительское ПТСР, а не воздействие Холокоста, связано с изменениями в функции оси гипоталамус–гипофиз–надпочечники, включая повышенное подавление уровня кортизола после введения дексаметазона и более низкие исходные уровни кортизола в крови потомков [1, 2]. Следует отметить, что наибольшие изменения в активности ГГАС этими авторами были обнаружены у тех потомков, у которых оба родителя страдали ПТСР, тогда как если болели только отцы, то у их взрослых потомков, напротив, чувствительность ГГАС к сигналам отрицательной обратной связи снижалась [17], и это, по мнению авторов, связано с риском развития у таких потомков депрессии.

В экспериментах на крысах было установлено, что более низкая исходная активность ГГАС играет решающую роль в формировании долгосрочных нейрональных и гормональных дисбалансов, лежащих в основе поведенческих симптомов, характерных для ПТСР [18, 19]. Эти данные также подтверждают мысль о том, что более низкий уровень активности ГГАС может являться фактором риска ПТСР.

Тем не менее, в экспериментальных исследованиях, выполненных на лабораторных грызунах, показано общее снижение активности ГГАС у потомков самцов, которые подвергались стрессированию в течение всего периода сперматогенеза [3], т.е. имели повышенный уровень глюкокортикоидов в крови, а не сниженный, как при моделировании ПТСР. Причем этот эффект не зависел от пола потомков и от того, в какой период онтогенеза (неполовозрелые и взрослые животные) применялись стрессорные процедуры к самцам.

Наши исследования показали, что моделирование ПТСР у самцов в парадигме “стресс–рестресс” приводит к сходным изменениям активности ГГАС у их взрослых потомков обоего пола. Мы выявили не только сниженный базальный уровень кортикостерона в крови таких потомков, но и снижение стрессорной реактивности ГГАС. Активированная стрессом ГГАС потомков отцов с моделированием ПТСР возвращалась к исходному более низкому состоянию в те же сроки, что и у потомков контрольных самцов отцов. Более того, у этих же потомков мы обнаружили повышение экспрессии белка глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и мПФК. Сходный профиль активности ГГАС и уровень глюкокортикоидных рецепторов в исследованных областях мозга были выявлены и у потомков самок отцов, у которых моделировали депрессию. При этом у потомков самцов тех отцов, у которых моделировали депрессию, базальная и стрессорная активность ГГАС не изменялась по сравнению с потомками контрольных отцов, но торможение их ГГАС после стрессорной активации была отсрочена, о чем свидетельствовал более высокий уровень кортикостерона в их крови через 3 ч после начала стрессирования. Характерно, что у этих самцов мы обнаружили более низкий уровень глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе и мПФК – структурах, ответственных в том числе за торможение стрессорной активности ГГАС [11]. Другими словами, эффекты моделирования разных психопатологий у самцов отцов на активность ГГАС их взрослых потомков различались только в отношении потомков самцов и

были схожи у потомков самок. Складывается впечатление, что у потомков самок изменение активности ГГАС происходит вследствие самого стресса отца, а у потомков самцов зависит от того, какую парадигму использовали для стрессирования самцов отцов и, вероятно, от уровня кортикостерона, который создавался в этих парадигмах.

Обращает на себя внимание выявленный нами факт более выраженного изменения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов во 2-м слое мПФК по сравнению с 5-м слоем. Цепь, посредством которой эфферентные проекционные нейроны из мПФК ингибируют ГГАС, включает вторичную активацию тормозных ГАМКергических нейронов в подобластях ядра ложа конечной полоски (BNST) [20]. Слой 5 является основным местом для проекционных нейронов, которые распространяются на подкорковые лимбические структуры, такие как BNST [21]. Вместе с тем, 2-й слой мПФК также участвует в регуляции активности ГГАС по механизму отрицательной обратной связи, а его пирамидные нейроны проявляет повышенную чувствительность к глюкокортикоидам [22]. Нейроны обоих слоев обильно экспрессируют глюкокортикоидные рецепторы. Учитывая эти данные, мы полагали, что снижение активности ГГАС, выявленное у потомков обоего пола самцов отцов с моделированием ПТСР, и самок – потомков отцов с моделированием депрессии в большей мере отразится на количестве глюкокортикоидных рецепторов в 5-м слое мПФК, а не во 2-м. Тем не менее, данный факт представляет определенный интерес для дальнейшего анализа.

В настоящий момент сложно предполагать, с чем может быть связан такой дифференциальный эффект на потомков самцов ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния их отцов. Отметим, что в упомянутых выше работах Yehuda и соавт. не было выявлено значимого гендерного влияния ПТСР родителей на потомков. Более того, было продемонстрировано, что у потомства отцов с посттравматическим стрессовым расстройством наблюдается более высокое метилирование экзона 1<sub>F</sub> промотора гена глюкокортикоидного рецептора (*NR3C1*), тогда как у потомства обоих родителей с ПТСР, напротив, более низкое метилирование. Метилирование промотора глюкокортикоидного рецептора 1<sub>F</sub> было в значительной степени связано с большим подавлением секреции кортизола после введения дексаметазона и не зависело от пола потомков [23]. Авторы пришли к заключению, что отцовский посттравматический стресс и материнское ПТСР, вероятнее всего, имеет различные механизмы трансгенерационной передачи признаков, связанных с травматическими событиями. Может ли сходный механизм, связанный с метилированием ДНК промотора гена глюкокортикоидных рецепторов, быть вовлечен в обнаруженное нами дифференциальное влияние отцовского ПТСР-подобного или депрессивно-подобного состояния на экспрессию белка глюкокортикоидных рецепторов в мозге и соответственное изменение активности ГГАС потомков самцов, нуждается в дальнейшем исследовании.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (47\_110\_ДРиОК).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (Н.Э.О.), написание и редактирование манускрипта (Н.Э.О., С.Г.П.), подготовка экспериментальных животных (Г.И.Х., В.К.А.), сбор данных (В.В.Р., С.Г.П., Г.И.Х.), обработка данных (В.К.А., Г.И.Х.)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yehuda R, Teicher MH, Seckl JR, Grossman RA, Morris A, Bierer LM* (2007) Parental posttraumatic stress disorder as a vulnerability factor for low cortisol trait in offspring of Holocaust survivors. *Archiv Gen Psychiatry* 64: 1040–1048.  
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.9.1040>
2. *Yehuda R, Blair W, Labinsky E, Bierer LM* (2007) Effects of parental PTSD on the cortisol response to dexamethasone administration in their adult offspring. *Am J Psychiatry* 164: 163–166.  
<https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.1.163>
3. *Rodgers AB, Morgan CP, Bronson SL, Revello S, Bale TL* (2013) Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *J Neurosci* 33: 9003–9012.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0914-13.2013>
4. *Rodgers AB, Bale TL* (2015) Germ cell origins of Posttraumatic stress disorder risk: the transgenerational impact of parental stress experience. *Biol Psychiatry* 78: 307–314.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.018>
5. *Ordyan NE, Pivina SG, Akulova VK, Kholova GI* (2021) Changes in the nature of behavior and the activity of the hypophyseal-adrenocortical system in the offspring of paternal rats subjected to stress in the stress–restress paradigm before mating. *Neurosci Behav Physiol* 51: 528–534.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01100-7>
6. *Andreasen NC* (2011) What is post-traumatic stress disorder? *Dialog Clin Neurosci* 13: 240–243.  
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2011.13.2/nandreasen>
7. *Whirledge S, Cidlowski JA* (2017) Glucocorticoids and reproduction: traffic control on the road to reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 28: 399–415.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.02.005>
8. *Pivina SG, Rakitskaya VV, Akulova VK, Ordyan NE* (2016) Activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal system in prenatally stressed male rats on the experimental model of post-traumatic stress disorder. *Bull Exp Biol Med* 160: 601–604.  
<https://www.doi.org/10.1007/s10517-016-3227-3>
9. *Czén B, Fuchs E, Wiborg O, Simon M* (2016) Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64: 293–310.  
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>
10. *Mironova V, Pivina SG, Rybnikova E* (2013) Effect of inescapable stress in rodent models of depression and posttraumatic stress disorder on CRH and vasopressin immunoreactivity in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Acta Physiol Hungar* 100: 395–410.  
<https://doi.org/10.1556/APhysiol.100.2013.4.4>
11. *McEwen BS, Nasca C, Gray JD* (2016) Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 41: 3–23.  
<https://doi.org/10.1038/npp.2015.171>
12. *Ordyan NE, Pivina SG, Baranova KA, Rakitskaya VV, Akulova VK, Kholova GI* (2021) Sex-dependent actions of prenatal stress on the activity of the hypothalamo-hypophyseal-adrenocortical system in rats: the role of corticosteroid receptors in the brain. *Neurosci Behav Physiol* 51: 357–366.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01079-1>
13. *Boas A, Kohtes J, Janssen V, Mülling C, Stelljes A, Zerbe H, Hässig M, Thole HH* (2006) Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor alpha, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacental uterine wall and foetal membranes. *Anim Reprod Sci* 91: 55–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.03.012>
14. *Solomon Z, Kotler M, Mikulincer M* (1988) Combat-related posttraumatic stress disorder among second generation Holocaust survivors: preliminary findings. *Am J Psychiatry* 145: 865–886.  
<https://doi.org/10.1176/ajp.145.7.865>
15. *Yehuda R, Schmeidler J, Giller EL, Siever LJ, Binder-Brynes K* (1998) Relationship between Posttraumatic stress disorder characteristics of Holocaust survivors and their adult offspring. *Am J Psychiatry* 155: 841–843.  
<https://doi.org/10.1176/ajp.155.6.841>
16. *Yehuda R, Schmeidler J, Wainberg M, Binder-Brynes K, Duvdevani T* (1998) Vulnerability to posttraumatic stress disorder in adult offspring of Holocaust survivors. *Am J Psychiatry* 155: 1163–1171.  
<https://doi.org/10.1176/ajp.155.9.1163>

17. Yehuda R, Bell A, Bierer LM, Schmeidler J (2008) Maternal, not paternal, PTSD is related to increased risk for PTSD in offspring of Holocaust survivors. *J Psychiatr Res* 42: 1104–1111. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.01.002>
18. Cohen H, Zohar J, Gidron Y, Matar MA, Belkind D, Loewenthal U, Kozlovsky N, Kaplan Z (2006) Blunted HPA axis response to stress influences susceptibility to posttraumatic stress response in rats. *Biol Psychiatry* 59: 1208–1218. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.12.003>
19. Danan D, Todder D, Zohar J, Cohen H (2021) Is PTSD-phenotype associated with HPA-axis sensitivity? Feedback inhibition and other modulating factors of glucocorticoid signaling dynamics. *Int J Mol Sci* 22: 6050. <https://doi.org/10.3390/ijms22116050>
20. Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE (2009) A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 29: 7330–7340. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5924-08.2009>
21. Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492: 145–177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
22. Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dammann M, McEwen BS, Morrison JH, Wearne SL, Hof PR (2008) Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Compar Neurol* 507(1): 1141–1150. <https://doi.org/10.1002/cne.21588>
23. Yehuda R, Daskalakis NP, Lehrner A, Desarnaud F, Bader HN, Makotkine I, Flory JD, Bierer LM, Meaney MJ (2014) Influences of maternal and paternal PTSD on epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor gene in Holocaust survivor offspring. *Am J Psychiatry* 171: 872–880. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.13121571>

### Differential Effect of Male Rat's PTSD-Like or Depression-Like Status before Mating on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis of Adult Offspring

N. E. Ordyan<sup>a,\*</sup>, S. G. Pivina<sup>a</sup>, G. I. Kholova<sup>a</sup>, V. K. Akulova<sup>a</sup>, and V. V. Rakitskaya<sup>a</sup>

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

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

There are now a growing number of observations on the transgenerational impact of paternal stress on various offspring functions without involving direct interaction between offspring and father. In the offspring of parents who suffered from posttraumatic stress disorder (PTSD) have been observed an increase in PTSD-like symptoms. In experiments where a chronically elevated level of corticosterone was created in male mice during the entire period of spermatogenesis, a decrease in the stress reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in the offspring of both sexes was shown. However, PTSD in patients creates a reduced level of glucocorticoids in the blood, and there are no experimental data on the effect of modeling PTSD in fathers on the activity of HPA axis of the offspring. The current study examined the relative influences of PTSD-like status (“stress–restress” paradigm) and depression-like status (“learned helplessness” paradigm) in male rats before mating on the HPA axis activity of their adult offspring. In addition to HPA axis activity, the expression of glucocorticoid receptors (GR) in the offspring was analyzed by quantitative immunocytochemistry in the hippocampus and medial prefrontal cortex (mPFC). We demonstrated that in female offspring of fathers with a PTSD-like or depressive-like status there is a decrease in basal and stress activity of the HPA axis in response to 30-min immobilization, which was accompanied by an increase in GR expression in the hippocampus and the 2nd layer mPFC. A similar profile of HPA axis activity was found in male offspring of fathers with modeling of PTSD. However, in male offspring of fathers with a depression-like status, the sensitivity of HPA axis to feedback signals decreased and was accompanied by a decrease in GR expression in the hippocampus and the 2nd layer of mPFC. We concluded that the PTSD- or depression-like status of male rats during the period of spermatogenesis has a differential effect on HPA axis activity and GR expression in the brain of their male offspring.

**Keywords:** “stress–restress”, “learned helplessness”, paternal stress, HPA axis, glucocorticoid receptor, hippocampus, medial prefrontal cortex, offspring, rat

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ЭКСПРЕССИЯ mTOR В НЕЙРОНАХ ТУБЕРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ  
ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ© 2022 г. П. А. Анфимова<sup>1</sup>, К. Ю. Моисеев<sup>1</sup>, В. В. Порсева<sup>1</sup>,  
Л. Г. Панкратова<sup>1</sup>, П. М. Маслоков<sup>1, \*</sup><sup>1</sup>Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия\*E-mail: [mpt@ysmu.ru](mailto:mpt@ysmu.ru)

Поступила в редакцию 31.05.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принята к публикации 16.07.2022 г.

Экспрессия мишени рапамицина млекопитающих (mammalian target of rapamycin, mTOR) и белка RICTOR определялась в нейронах туберальной области гипоталамуса крысы при помощи иммуногистохимического метода у самцов крыс в возрасте 3, 6, 12 и 24 мес. Мы впервые показали наличие mTOR-иммунопозитивных (ИП) нейронов в дугообразном (ARN), дорсомедиальном (DMN) и вентромедиальном (VMN) ядрах гипоталамуса, а также RICTOR-ИП нейронов в ARN и VMN у крыс разного возраста. При старении увеличивается процент mTOR-ИП нейронов и уменьшается доля mTOR-ИП нейронов, колокализующих RICTOR в ARN. В VMN и DMN наибольший процент mTOR-ИП нейронов отмечен у крыс в возрасте 6 мес. Наибольший процент RICTOR-ИП нейронов отмечен в VMN 6-месячных крыс. Таким образом, при старении наблюдаются изменения экспрессии mTOR в нейронах туберальных ядер гипоталамуса.

*Ключевые слова:* гипоталамус, mTOR, туберальная область, старение

DOI: 10.31857/S0869813922090126

Мишенью рапамицина у млекопитающих (mammalian target of rapamycin, mTOR) служит серин/треониновая киназа, принадлежащая к семейству киназ, родственных фосфоинозитид-3-киназе (PI3K). Установлено, что mTOR может регулировать различные клеточные процессы, включая клеточный рост, выживание клеток и аутофагию. Наличие питательных веществ и кислорода вызывает активацию пути mTOR, что усиливает анаболические процессы, включая биосинтез белков и липидов [1]. mTOR может быть представлена двумя различными белковыми комплексами: mTOR комплекс 1 (mTORC1) и mTOR комплекс 2 (mTORC2), каждый из которых содержит различные белковые компоненты и фосфорилирует разные субстраты. mTORC1 образован взаимодействием протеинкиназы mTOR с белком Raptor, а также субстратом Akt PRAS40. mTORC2 образован взаимодействием mTOR с каркасным белком RICTOR, а также с другими mTORC2-специфическими белковыми субъединицами, включая mSin1 и Protor-1/2. Как mTORC1, так и mTORC2 включают mLST8/GβL, необходимый для сборки и стабильности комплекса, а также регуляторный белок DEPTOR [2].

mTORC1 ингибируется рапамицином и интегрирует гормональные и сигналы внешней среды, стимулирует биосинтез белка и аутофагию. mTORC2 является ключевым эффектором сигнального пути инсулина, регулирующим несколько субстратов в каскаде от рецептора инсулина/инсулиноподобного фактора роста 1

(insulin-like growth factor 1, IGF1) [2]. Он значительно менее чувствителен к рапамицину, играет роль в организации цитоскелета и является важным эффектором передачи сигналов инсулина/PI3K [3]. По данным литературы, гипоталамическая активность mTORC2 увеличивается с возрастом у мышей, и генный нокаут этого комплекса в нейронах гипоталамуса приводил к увеличению жировой массы, нарушению гомеостаза глюкозы и снижению продолжительности жизни [4].

Одной из возможных причин старения является дисфункция гипоталамуса, в частности возрастное повышение порога чувствительности гипоталамуса к гомеостатическим сигналам [5, 6]. При этом в туберальной группе ядер, в частности в ARN, VMN и DMN, у старых крыс наблюдаются морфологические, нейрохимические и функциональные изменения нейронов [7–9]. Тем не менее, данных об изменении экспрессии mTOR, а также mTORC2 при старении в литературе нет.

Целью исследования явилось определение локализации mTOR-, mTORC2/RICTOR-экспрессирующих нейронов в туберальной группе ядер гипоталамуса и колокализации mTOR с RICTOR.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на самцах крыс ( $n = 20$ ) линии Вистар в возрасте 3 ( $n = 5$ ), 6 ( $n = 5$ ), 12 ( $n = 5$ ) и 24 мес. ( $n = 5$ ) с соблюдением “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР), в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями этического комитета ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава РФ.

После введения летальной дозы уретана (3 г/кг, внутривенно), животных перфузировали транскардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS; 0.01 M, pH 7.4) (Биолот, Россия). С целью проведения иммуногистохимических исследований, животных ( $n = 20$ ) затем перфузировали 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США) на PBS. После перфузии головной мозг извлекали и иссекали участок гипоталамуса в области срединного возвышения согласно координатам атласа мозга крыс [16]. Серии коронарных срезов гипоталамуса толщиной 14 мкм изготавливали с помощью криотома Shandon E (Thermo Scientific, Великобритания), монтировали на стекла Superfrost/Plus (Thermo Scientific, США), высушивали при комнатной температуре и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

С целью выявления нейронов, содержащих mTOR и mTORC2 применялось двойное иммуномечение антителами. Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% ослиной сыворотки (“Jackson ImmunoResearch”, США), 1% тритона X-100, 0.1% бычьего сывороточного альбумина, 0.05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами (кроличьи против mTOR, 1 : 200, Invitrogen, PA5-34663; мышьиные против mTOR, 1 : 100, Santa Cruz, sc-517464; мышьиные против RICTOR (компонент комплекса mTORC2), 1 : 100, Santa Cruz, sc-271081) в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами в течение 2 ч. Вторичные антитела были конъюгированы с флуорохромами – флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) и индокарбоцианином (Cy3) (разведение 1 : 150, “Jackson ImmunoResearch”, США) с эмиссией в зеленой и красной области спектра соответственно. Окраску клеток всей популяции нейронов проводили красителем, флуоресцирующим в зеленой области спектра, NeuroTrace Green Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США) – разведение 1 : 200. После этого срезы отмывали в PBS и заключали в среду для флуоресцентной микроскопии VectaShield (Vector Laboratories, США). Для исключения неспецифической реакции часть срезов инкубировали без первичных и/или вторичных антител.

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе “Olympus BX43” (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD камерой Tucsen FL-20 с программным обеспечением Mosaic V2.1 (Китай). Для выявления меченых нейронов использовали каждый третий из серийных срезов. Число иммунопозитивных (ИП) нейронов определяли на изображениях срезов, полученных под объективом 20×/0.50. Площадь изображений составляла 0.14 мм<sup>2</sup>. Долю ИП нейронов определяли как их отношение к общему количеству нейронов, выявленных NeuroTrace Fluorescent Nissl Stains, или суммарному количеству mTOR-ИП и RICTOR-ИП нейронов, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нейроны, в которых срез прошел через ядро с видимым ядрышком и с флуоресценцией, превышающей фоновое свечение. Процент ИП нейронов определяли с помощью программы Image J (НИН, США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

mTOR-ИП нейроны обнаруживались во всех исследованных возрастных группах в ARN, DMN и VMN (рис. 1). В ходе возрастного развития процент mTOR-содержащих нейронов достоверно увеличивался в ARN в течение первого года жизни ( $p < 0.05$ ) и далее не изменялся у старых животных ( $p > 0.05$ ) (рис. 2). В DMN доля mTOR-ИП нейронов достигала максимального значения к первому полугодю жизни, снижалась к первому году и далее достоверно не отличалась от старых животных ( $p > 0.05$ ). В VMN у 3-месячных крыс более половины нейронов ядра была mTOR-ИП, процент ИП нейронов достоверно увеличивался и достигал максимального значения к первому полугодю жизни ( $p < 0.05$ ), далее снижался у 12-месячных крыс и был минимальным у старых 24-месячных животных ( $p < 0.05$ ).

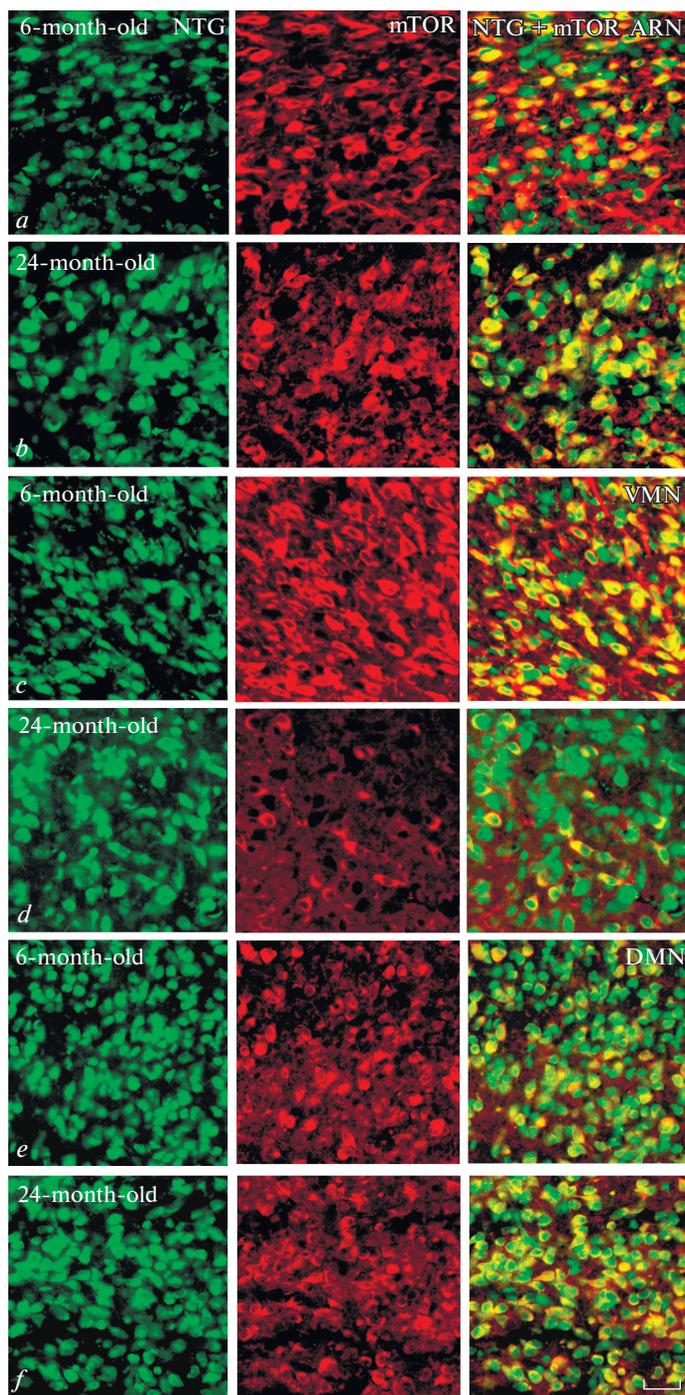
RICTOR-ИП нейроны выявлялись в ARN и VMN (рис. 3), но отсутствовали в DMN. В ARN у 3-месячных и старых животных содержание этого белка было очень низким, но у 6- и 12-месячных животных значительно повышалось ( $p < 0.001$ ). В VMN 3-месячных животных четверть нейронов была RICTOR-ИП, процент ИП нейронов возрастал (рис. 2) и был максимален у 6-месячных крыс ( $p < 0.05$ ), далее снижался у 12-месячных животных и был минимальным у старых крыс ( $p < 0.05$ ).

При исследовании колокализации mTOR и RICTOR были выявлены нейроны, содержащие только mTOR, а также ИП нейроны к mTOR и RICTOR. Нейроны, ИП только к RICTOR, отсутствовали. В ARN процент нейронов, колокализующих mTOR и RICTOR, был максимален у 3-месячных крыс (рис. 2), далее достоверно снижался в онтогенезе и был минимален у старых 24-месячных животных ( $p < 0.05$ ). В VMN процент mTOR/RICTOR-ИП нейронов возрастал с 3 мес., достигая максимума у 6-месячных крыс ( $p < 0.05$ ), а далее снижался у 12-месячных животных без достоверных отличий от старых крыс ( $p > 0.05$ ).

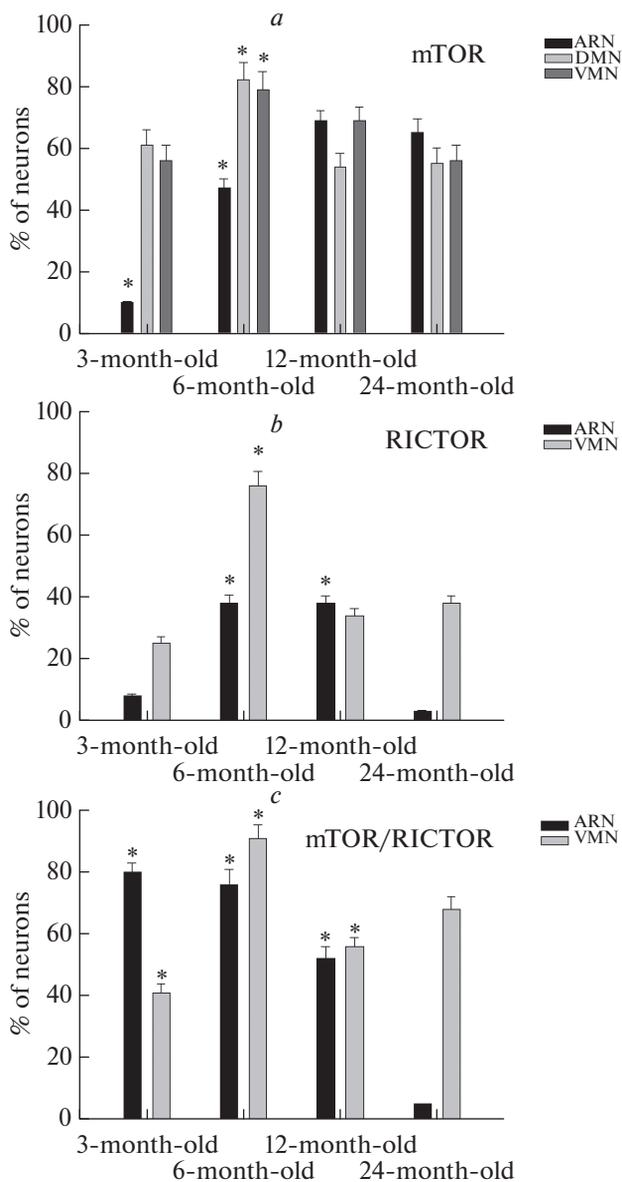
### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты нашего исследования свидетельствуют, что при старении происходят изменения экспрессии mTOR сигнального пути, в т.ч. компонентов mTORC1 и mTORC2.

Мы впервые показали наличие mTOR-ИП нейронов в ARN, DMN и VMN, а также RICTOR-ИП нейронов в ARN и VMN у крыс разного возраста. Нами впервые обнаружено, что при старении увеличивается процент mTOR-ИП нейронов клеток в ARN. В VMN и DMN наибольший процент mTOR-ИП нейронов отмечен у крыс в возрасте 6 мес. Литературные данные свидетельствуют, что усиление сигнального пути mTORC1 в нейронах гипоталамуса, содержащих проопиомеланокортин



**Рис. 1.** Микрофотографии с двойным мечением: окраска NeuroTrace Green (NTG, зеленый, левый ряд), mTOR (красный, средний ряд), комбинированное фото mTOR + NeuroTrace Green (правый ряд) нейронов ARN (*a, b*), VMN (*c, d*), DMN (*e, f*) 6-месячных (*a, c, e*) и 24-месячных (*b, d, f*) крыс. Флуоресценция Cy3 (красный), NeuroTrace Green (зеленый). Масштаб – 50 мкм.

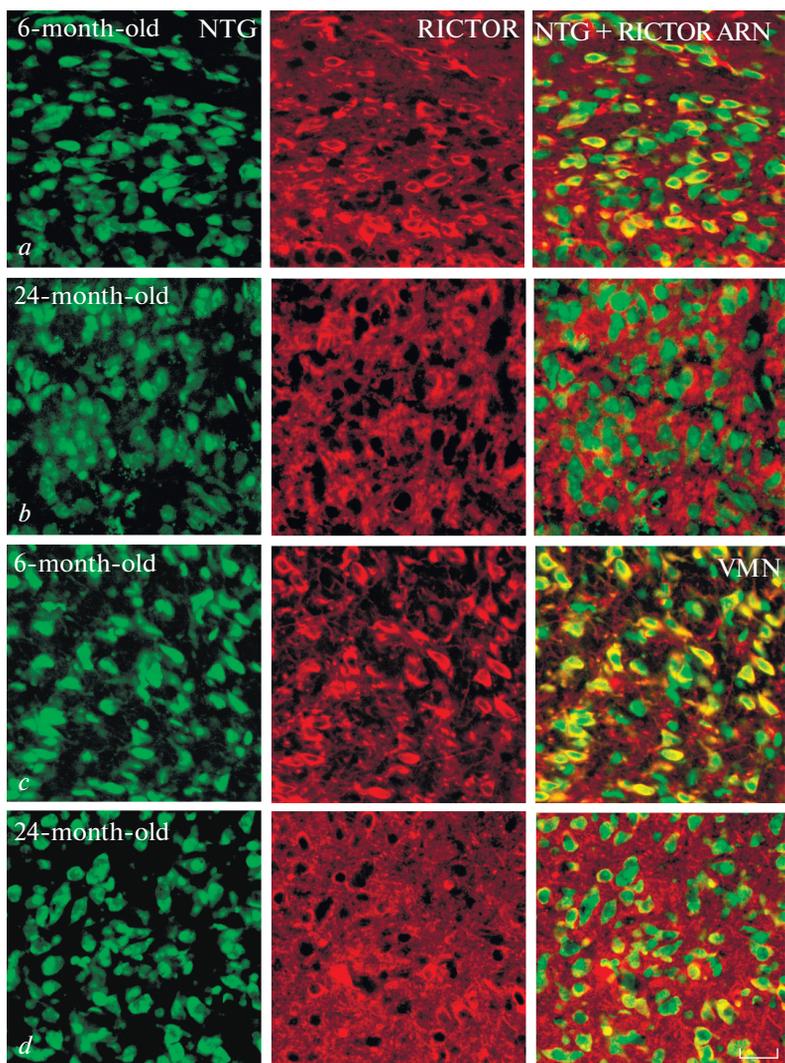


**Рис. 2.** Процент mTOR-ИП (a), RICTOR-ИП (b), mTOR-ИП, колокализирующих RICTOR (c) нейронов в ARN, VMT, DMN 3-, 6-, 12-, 24-месячных крыс.

\* $p < 0.05$ , различия достоверны по сравнению с 24-месячными животными.

(РОМС) способствует возрастному ожирению, вызывая сайленсинг этих нейронов и, как следствие, увеличение потребления пищи [10].

Нами выявлено уменьшение доли mTOR-ИП нейронов, колокализирующих RICTOR в ARN. Наибольший процент RICTOR-ИП нейронов отмечен в VMN 6-месячных крыс. У 12-месячных и старых 24-месячных животных процент RICTOR-ИП ней-



**Рис. 3.** Микрофотографии с двойным мечением: окраска NeuroTrace Green (NTG, зеленый, левый ряд), RICTOR (красный, средний ряд), комбинированное фото RICTOR + NTG (правый ряд) нейронов ARN (*a, b*), VMN (*c, d*) 6-месячных (*a, c*) и 24-месячных (*b, d*) крыс. Флуоресценция Су3 (красный), NeuroTrace Green (зеленый). Масштаб – 50 мкм.

ронов снижается. RICTOR является компонентом mTORC2. Выключение RICTOR в ЦНС приводило к повышению потребления пищи и ожирению, гипергликемии натошак. Подобный фенотип также наблюдался после нокаута RICTOR, особенно в нейронах, ИП к POMC, тогда как нокаут в нейронах, ИП к агути-подобному пептиду (AgRP) имел минимальные эффекты. Хотя механизм, с помощью которого mTORC2 регулирует толерантность к глюкозе в POMC-ИР не ясен, мыши с выключением рецептора инсулина в нейронах демонстрировали частично сходные фенотипы с мышами, лишенными RICTOR в POMC-ИП нейронах, что указывает на критическую роль mTORC2 в регуляции метаболизма [11]. Учитывая, что старе-

ние сопровождается метаболическим синдромом, можно предположить участие нейронов гипоталамуса, прежде всего ARN, в этом процессе, что сопровождается повышением экспрессии mTOR и снижением экспрессии mTORC2 и RICTOR.

Генетическое ингибирование передачи сигналов mTOR, а также применение рапамицина может увеличивать продолжительность жизни дрожжей, червей и мух [12–14]. Нокаут по гену *Rictor* сильно сокращает продолжительность жизни самцов, но не самок мышей [15]. Передача сигналов mTORC2 также значительно повышена у долгоживущих карликовых мышей Snell и мышей с нокаутом рецептора гормона роста [16]. Ингибирование сигнального пути инсулина/IGF1/mTOR может быть важным механизмом, посредством которого вмешательства (например, рапамицин, ограничение калорий), увеличивают продолжительность жизни [17, 18].

Старение сопровождается повышением порога чувствительности нейронов гипоталамуса к регуляторным сигналам. В предыдущих исследованиях нами установлено, что при старении снижается экспрессия микроРНК *Let-7a* в ядрах медиобазальной группы ядер гипоталамуса, преимущественно у самцов [19]. Члены семейства микроРНК *Let-7* участвуют в регуляции метаболизма глюкозы, действуют как супрессоры многих генов, участвующих в сигнальном пути инсулина, включая RICTOR [20]. В некоторых тканях, например, в скелетной мышечной и белой жировой, *let-7* подавляет активацию mTORC1, вызывая аутофагию при недостатке питательных веществ [21].

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что при старении у самцов происходят изменения экспрессии mTOR, в том числе компонента mTORC2 главным образом в ARN гипоталамуса. Избирательное влияние на эти сигнальные пути может быть использовано для разработки средств, увеличивающих продолжительность жизни.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана РФ (грант № 19-15-00039).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – П.М.М., сбор данных – П.А.А., К.Ю.М., обработка данных – В.В.П., Л.Г.П., написание и редактирование статьи – П.М.М., В.В.П.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Simcox J, Lamming DW* (2022) The central mTOR of metabolism. *Dev Cell* 57(6): 691–706. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.02.024>
2. *Kennedy BK, Lamming DW* (2016) The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand Conductor of Metabolism and Aging. *Cell Metab* 23(6): 990–1003. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.009>
3. *Liu GY, Sabatini DM* (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21(4): 183–203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>
4. *Chellappa K, Brinkman JA, Mukherjee S, Morrison M, Alotaibi MI, Carbajal KA, Alhadeff AL, Perron IJ, Yao R, Purdy CS, DeFelice DM, Wakai MH, Tomasiewicz J, Lin A, Meyer E, Peng Y, Arriola Apelo SI, Puglielli L, Betley JN, Paschos GK, Baur JA, Lamming DW* (2019) Hypothalamic mTORC2 is essential for metabolic health and longevity. *Aging Cell* 18(5): e13014. <https://doi.org/10.1111/acel.13014>

5. Дильман ВМ (1981) Большие биологические часы (Введение в интегральную медицину) Знание. [*Dilman VM* (1981) Large biological clock: (An introduction to integral medicine) Znanic. (In Russ)].
6. Masliukov PM, Nozdrachev AD (2021) Hypothalamic Regulatory Mechanisms of Aging. *J Evol Biochem Phys* 57: 473–491.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093021030030>
7. Moiseev KY, Vishnyakova PA, Porseva VV, Masliukov AP, Spirichev AA, Emanuilov AI, Masliukov PM (2020) Changes of nNOS expression in the tuberal hypothalamic nuclei during ageing. *Nitric Oxide* 100–101: 1–6.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.04.002>
8. Moiseev KY, Spirichev AA, Vishnyakova PA, Pankrasheva LG, Masliukov PM (2021) Changes of discharge properties of neurons from dorsomedial hypothalamic nuclei during aging in rats. *Neurosci Lett* 762: 136168.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136168>
9. Vishnyakova PA, Moiseev KY, Spirichev AA, Emanuilov AI, Nozdrachev AD, Masliukov PM (2021) Expression of calbindin and calretinin in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei during aging. *Anat Rec (Hoboken)* 304: 1094–1104.  
<https://doi.org/10.1002/ar.24536>
10. Martínez de Morentin PB, Martínez-Sánchez N, Roa J, Ferno J, Nogueiras R, Tena-Sempere M, Dieguez C, Lopez M (2014) Hypothalamic mTOR: the rookie energy sensor. *Curr Mol Med* 14(1): 3–21.  
<https://doi.org/10.2174/1566524013666131118103706>
11. Reijfsnyder PC, Flurkey K, Te A, Harrison DE (2016) Rapamycin treatment benefits glucose metabolism in mouse models of type 2 diabetes. *Aging (Albany NY)* 8(11): 3120–3130.  
<https://doi.org/10.18632/aging.101117>
12. Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Müller F (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426(6967): 620.  
<https://doi.org/10.1038/426620a>
13. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460(7253): 392–395.  
<https://doi.org/10.1038/nature08221>
14. Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, Mizunuma M, Narasimhan SD, Neumann-Haefelin E, Sabatini DM, Blackwell TK (2012) TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab* 15(5): 713–724.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.007>
15. Lamming DW, Mihaylova MM, Katajisto P, Baar EL, Yilmaz OH, Hutchins A, Gultekin Y, Gaither R, Sabatini DM (2014) Depletion of Rictor, an essential protein component of mTORC2, decreases male lifespan. *Aging Cell* 13(5): 911–917.  
<https://doi.org/10.1111/accel.12256>
16. Dominick G, Berryman DE, List EO, Kopchick JJ, Li X, Miller RA, Garcia GG (2015) Regulation of mTOR activity in Snell dwarf and GH receptor gene-disrupted mice. *Endocrinology* 156(2): 565–575.  
<https://doi.org/10.1210/en.2014-1690>
17. Green CL, Lamming DW, Fontana L (2022) Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23(1): 56–73.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00411-4>
18. Duran-Ortiz S, List EO, Basu R, Kopchick JJ (2021) Extending lifespan by modulating the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis: coming of age. *Pituitary* 24(3): 438–456.  
<https://doi.org/10.1007/s11102-020-01117-0>
19. Porseva VV, Levshin NYu, Moiseev KYu, Pankrasheva LG, Baranov AA, Pavlov AV, Nozdrachev AD, Masliukov PM (2021) Let-7a, mir-9, mir-132 and mir-218 microRNA Expression in the Dorsomedial and Ventromedial Hypothalamic Nuclei during Aging in Rats. *Adv Gerontol* 11(4): 346–350.  
<https://doi.org/10.1134/S207905702104010X>
20. Jang S (2019) A Regulator of Metabolic Reprogramming: MicroRNA Let-7. *Transl Oncol* 12(7): 1005–1013.  
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.04.013>
21. Liu WM, Cheng RR, Niu ZR, Chen AC, Ma MY, Li T, Chiu PC, Pang RT, Lee YL, Ou JP, Yao YQ, Yeung WSB (2020) Let-7 derived from endometrial extracellular vesicles is an important inducer of embryonic diapause in mice. *Sci Adv* 6(37):eaaz7070.  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7070>

**mTOR Expression in Neurons of the Tuberal Region of the Rat Hypothalamus during Aging**

**P. A. Anfimova<sup>a</sup>, K. Yu. Moiseev<sup>a</sup>, V. V. Porseva<sup>a</sup>,  
L. G. Pankrasheva<sup>a</sup>, and P. M. Masliukov<sup>a, \*</sup>**

*<sup>a</sup>Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia*

*\*e-mail: mpm@ysmu.ru*

The expression of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and the RICTOR protein was studied in neurons of the tuberal region of the rat hypothalamus by immunohistochemistry in male rats aged 3, 6, 12, and 24 months. We first have shown the presence of mTOR-immunopositive (IP) neurons in the arcuate (ARN), dorsomedial (DMN), and ventromedial (VMN), as well as RICTOR-IP neurons in the ARN and VMN in rats of different ages. With aging, the percentage of mTOR-IP neurons increases and the proportion of mTOR-IP neurons colocalizing RICTOR decreases in the ARN. In VMN and DMN, the highest percentage of mTOR-IP neurons was observed in 6-month-old rats. The highest percentage of RICTOR-IP neurons was found in the VMN of 6-month-old rats. Thus, changes in mTOR expression in the neurons of the tuberal nuclei of the hypothalamus are observed with aging.

*Keywords:* hypothalamus, mTOR, tuberal region, aging

## РАННИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ АРТЕРИЙ И СОСУДОВ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

© 2022 г. И. А. Царева<sup>1</sup>, \*, Г. Т. Иванова<sup>1</sup>, Г. И. Лобов<sup>1</sup>

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

\*E-mail: innatsareva@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.06.2022 г.

После доработки 06.08.2022 г.

Принята к публикации 08.08.2022 г.

Изучены ранние изменения в сердечно-сосудистой системе молодых крыс Вистар при моделировании метаболического синдрома применением фруктозной нагрузки. Установлено, что несмотря на некоторое снижение массы тела у крыс, находившихся на фруктозной диете, по сравнению с крысами контрольной группы, у этих животных были выявлены признаки метаболического синдрома: гипергликемия, инсулинорезистентность, дислипидемия, повышение активности симпатической нервной системы и артериальная гипертензия. Изменения со стороны брыжеечных артерий заключались в повышении реактивности на фенилэфрин и ослаблении ацетилхолин-индуцированной дилатации, что объясняется снижением продукции эндотелием NO, которое в определенной степени компенсируется повышением производства эндотелиального гиперполяризующего фактора, реализующего свой эффект через активацию  $Ca^{2+}$ -чувствительных  $K^+$ -каналов промежуточной проводимости. Изменения в гладкомышечных клетках артерий крыс, вызванные фруктозной нагрузкой, заключались в ингибировании растворимой гуанилатциклазы. В микроциркуляторном русле кожи крыс, получавших фруктозную нагрузку, перфузия сохранялась на уровне, характерном для крыс контрольной группы, при этом установлено повышение нейрогенного тонуса и ослабление эндотелийзависимого тонуса микрососудов кожи. Показано также уменьшение продукции NO в сосудах микроциркуляторного русла, которое компенсируется эндотелиальным производством других вазодилатирующих факторов.

*Ключевые слова:* метаболический синдром, лазерная доплеровская флоуметрия, эндотелиальная дисфункция, фруктозная нагрузка

DOI: 10.31857/S0869813922090084

Метаболический синдром (МС) в XXI веке представляет собой тихую пандемию, которая является серьезной проблемой для общественного здравоохранения во всем мире. Около 20% взрослого населения Земли (более миллиарда человек) страдают от этого симптомокомплекса [1]. В России распространенность МС высокая и составляет в различных городах среди населения в возрасте от 25 до 74 лет от 35.3 до 53.1% (при использовании трех вариантов критериев МС) [2]. В настоящее время нет единого мнения относительно определения МС и критериев диагностики, но общепризнанно, что он характеризуется сосуществованием ряда метаболических нарушений, включающих несколько факторов риска, таких как резистентность к инсулину, артериальная гипертензия, атерогенная дислипидемия,

протромботическое и провоспалительное состояние, которые обычно связаны с накоплением висцерального жира и составляют прогностический набор факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. МС сопровождается 5-кратным увеличением риска развития сахарного диабета 2-го типа (СД2) и 3-кратным увеличением риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (риск инсульта увеличивается в 2–4 раза, риск инфаркта миокарда в 3–4 раза) по сравнению с теми, у кого МС нет [3]. Ядром синдрома являются четыре фактора риска: резистентность к инсулину, артериальная гипертензия, висцеральное ожирение и дислипидемия [4].

Хотя способы определения МС у детей и подростков остаются спорными, обширные исследования в этой области показывают, что МС затронул и эту когорту населения. Потребление детьми и подростками высококалорийной пищи с фруктозой приводит к развитию у них МС. Распространенность МС у детей в США составляет до 9.8%, у подростков – до 6.3% [5, 6]. У детей часто не все компоненты МС встречаются одновременно. Наиболее ранними проявлениями МС являются дислипидемия и артериальная гипертензия [5].

Высокая распространенность, общественная значимость и высокие риски осложнений приводят к интенсивному изучению этиологии и патогенеза МС. По данным PubMed, за последнее десятилетие было опубликовано около 50 000 статей, посвященных исследованию различных механизмов развития МС, однако многие аспекты патогенеза МС сложны и до конца не изучены [7].

Использование животных в эксперименте имело и имеет большое значение в медицинских исследованиях, в том числе и для изучения обмена веществ. Преимуществом использования животных моделей для изучения МС является возможность наблюдения за гистологическими, функциональными, биохимическими и морфологическими изменениями при МС, что для человека затруднительно, а порой и невозможно. Основными моделями грызунов, используемыми для изучения ожирения и МС, являются генетически модифицированные модели и модели ожирения, вызванного диетой (diet-induced obesity (DIO)). Животные модели DIO наиболее близки к метаболическому синдрому у людей [8]. Однако результаты исследований часто противоречивы, в основном в отношении состава рациона и типа используемой модели [9]. Поиск моделей, которые представляют ожирение и МС так же, как и у людей, может помочь понять не только патофизиологию этих состояний, но и позволить разработать более эффективные методы лечения. Полигенная линия крыс Вистар достаточно широко использовалась для изучения ожирения, вызванного диетой, и продемонстрировала существенное увеличение массы тела, но результаты изменения инсулинемии были противоречивы. У некоторых животных развивалась гиперинсулинемия, а у других нет [10]. Большинство диет были разработаны с комбинацией продуктов с высоким содержанием углеводов и жиров [11]. Особой разновидностью диет с высокой долей углеводов является диета с высоким содержанием фруктозы. В целом, диеты с высоким содержанием фруктозы имитируют диету человека и, когда они связаны с высоким содержанием жира, способствуют увеличению веса, развитию абдоминального жира, гипергликемии и гиперинсулинемии у животных [12]. Фруктоза играет важную роль в развитии метаболического синдрома, а также самого ожирения, поскольку этот сахар приводит не только к резистентности к инсулину, но и к резистентности к лептину, что сопровождается увеличением веса [13]. Биологической потребности в пищевой фруктозе нет, это всего лишь промежуточная молекула в процессе метаболизма глюкозы. Концентрация циркулирующей фруктозы в периферической крови в 500 раз ниже по сравнению с глюкозой. Однако потребление фруктозы людьми в настоящее время, особенно в развитых странах, чрезмерно из-за потребления искусственно подслащенных напитков и разнообразных продуктов питания. Большой приток фруктозы в печень вызывает накопление триглицеридов и холе-

стерина из-за ее липогенных свойств, что впоследствии приводит к снижению чувствительности к инсулину, резистентности к инсулину и непереносимости глюкозы [4, 14].

Исследование метаболизма фруктозы выявило преимущество фруктозной диеты в индукции МС на животных моделях по сравнению с глюкозой или крахмалом. Существует высокая корреляция между хроническим высоким потреблением фруктозы с повышенным потреблением энергии, массой тела, ожирением, гипертриглицеридемией, гиперлипидемией, артериальной гипертензией и снижением чувствительности к инсулину у лабораторных животных, приводящих к МС [15]. Что касается количества потребляемой фруктозы, необходимого для развития МС, то исследование, проведенное Sanchez-Lozada и соавт. [16] показало, что даже 10% фруктозы в питьевой воде достаточно для развития артериальной гипертензии и гиперлипидемии у крыс Sprague-Dawley и Вистар.

С момента формулирования определения МС клинические исследования и исследования на животных проводились с целью изучения различных патофизиологических процессов, которые вовлечены в его развитие, в т.ч. и артериальной гипертензии, сопровождающейся тяжелыми осложнениями (инфаркт миокарда, инсульт, повреждение почек, ретинопатия). При МС развитие артериальной гипертензии представляет собой сложный процесс, включающий множество различных сигнальных путей. На сегодняшний день предложено несколько патофизиологических механизмов развития артериальной гипертензии. Принято считать, что основными являются инсулинорезистентность, наличие ожирения, активация симпатической нервной системы и задержка натрия [17]. При этом важнейшим патогенетическим механизмом развития артериальной гипертензии при МС является развивающаяся эндотелиальная дисфункция, сопровождающаяся снижением биодоступности NO (в результате снижения его продукции или инактивации активными формами кислорода), снижением доступности других вазодилататоров (простациклин, эндотелиальный гиперполяризующий фактор) и/или увеличением продукции или активности сосудосуживающих веществ (включая эндотелин-1, простагландины и ангиотензин II) [18, 19].

Целью настоящей работы было исследование ранних функциональных изменений в артериях и сосудах микроциркуляторного русла молодых крыс при моделировании МС с использованием фруктозной нагрузки.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Крысы для исследования были получены из Центра коллективного пользования “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Все манипуляции с животными соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации. Протокол исследований одобрен этической комиссией Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

26 самцов крыс стока Вистар в возрасте 4 недель были разделены случайным образом на две группы: 15 особей получали 20%-ную фруктозную нагрузку в питьевой воде на протяжении 16 недель (крысы high-fructose diet (HFrD)); 11 особей – контрольная группа, получали обычную питьевую воду. Обе группы крыс имели свободный доступ к пище и воде (раствору фруктозы). Животные содержались в одинаковых условиях: по 5 крыс в стандартной клетке при температуре в помещении 20–22°C и световом режиме 12 ч свет/12 ч темнота. На протяжении 16 недель четырежды (один раз в месяц) измеряли уровень глюкозы в плазме натощак следующим образом: после 12-часового голодания, под местной анестезией (крем EMLA; 2.5% лидокаин, 2.5% прилокаин, Швеция) у животного надрезали скальпелем кон-

чик хвоста и каплю крови помещали на тестовую полоску глюкометра Accu Chek Active (Германия) и считывали результат.

На 16-й неделе проводили тесты на толерантность к глюкозе и инсулинорезистентность. Глюкозотолерантный тест проводили по следующей схеме: после 12-часового голодания измеряли концентрацию глюкозы в крови вышеуказанным способом. Затем животным внутрибрюшинно вводили 40%-ный раствор глюкозы из расчета 2 г глюкозы/кг массы и через 30, 45, 60, 90, 120 и 240 мин забирали кровь для исследований концентрации глюкозы. По окончании теста животные получали доступ к пище. Тест на инсулинорезистентность проводили по следующей схеме: после 3-часового голодания измеряли базальную концентрацию глюкозы. Затем внутрибрюшинно вводили инсулин (Инсуман Рапид ГТ, Sanofi Aventis, Германия) в дозе 0.75 Ед/кг массы. Через 15, 30, 45, 60, 90, 120 и 180 мин с момента введения инсулина проводили измерение концентрации глюкозы в крови. По окончании теста животные получали доступ к пище.

Измерение артериального давления у бодрствующих крыс выполняли манжеточным методом на хвосте, используя систему неинвазивного измерения кровяного давления у грызунов “Систола” (“Нейроботикс”, Москва). Для каждой крысы выполняли 3 замера и рассчитывали среднее значение измерений.

В конце 16-й недели производили оценку кровотока в микроциркуляторном русле кожи методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с помощью анализатора лазерной микроциркуляции крови “ЛАЗМА ПФ” (НПП “Лазма”, Россия). Анализатор помещали на предварительно побритую кожу спины наркотизированного животного (крыс анестезировали внутрибрюшинным введением 50 мкг/кг золетила (Золетил 100, Virbac Sante Animale, Франция) и 50 мкг/кг ксилета (Pharmagist Ltd., Венгрия). Метод ЛДФ предусматривает зондирование ткани лазерным излучением в объеме зондируемой ткани около 1 мм<sup>3</sup>, т.е., в зондируемой области оказываются артериолы, терминальные артериолы, капилляры, посткапиллярные вены, вены и артериоло-венулярные анастомозы. Амплитуда отраженного сигнала при ЛДФ формируется в результате отражения излучения от эритроцитов, двигающихся с разной линейной скоростью по всем сосудам микроциркуляторного русла. На выходе прибора формируется итог флоуметрии – сигнал, амплитуда которого пропорциональна количеству и скорости движения эритроцитов в зондируемой области [20].

В данном исследовании ЛДФ регистрировали в три этапа, каждый продолжительностью по 8 мин: в исходном состоянии, после 2-минутного ионофореза ацетилхолина (АХ, 1%, (Sigma-Aldrich, США) с помощью прибора для гальванизации и лекарственного ионофореза “ЭЛФОР-ПРОФ” (Россия) и после 2-минутного введения нитропруссид натрия (НП, 1%, ICN Biomedicals, США). Области введения АХ и НП были разделены и не перекрывались. В результате исследования были зарегистрированы: показатель микроциркуляции, максимальные значения колебаний перфузии в эндотелиальном (Аэ), нейрогенном (Ан) и миогенном (Ам) диапазонах и среднее квадратическое отклонение. В последующем рассчитывали эндотелиальный, нейрогенный и миогенный компоненты сосудистого тонуса, которые характеризуют активные механизмы контроля микрогемодинамики.

Расчет компонентов микрососудистого тонуса проводили по формуле:

$$\text{Эндотелиальный тонус (ЭТ)} = \frac{\sigma \times P(\text{ср})}{A_{\text{э}} \times M},$$

где  $\sigma$  – среднее квадратическое отклонение показателя микроциркуляции;  $P(\text{ср})$  – среднее артериальное давление;  $A_{\text{э}}$  – наибольшее значение амплитуды колебаний перфузии в эндотелиальном диапазоне;  $M$  – среднее значение показателя микроциркуляции.

Нейрогенный и миогенный компоненты сосудистого тонуса рассчитывали по такой же формуле, заменяя  $A_z$  на  $A_n$  и  $A_m$ .

На следующем этапе исследования *in vivo* оценивали реактивность артерий брыжейки у 14 животных (7 крыс, получавших фруктозную нагрузку, 7 крыс – контроль). Исследование проводили на установке, включающей подогреваемый стол, специальную подогреваемую камеру, микроскоп (МСП-2, ЛОМО, Россия) и видеокамеру (Basler, Германия). Обработку результатов проводили в программе MultiMedia Catalog (ММС, Россия). Крыс наркотизировали раствором Золетил 100 (Vibrac, Франция) из расчета тилетамин/золазепам – 10 мг/кг массы тела крысы, с предварительной премедикацией раствором Рометара (Bioveta, Чешская Республика) из расчета ксилазин – 5 мг/кг массы крысы. У наркотизированной крысы через разрез брюшной стенки выводили петлю тонкого кишечника, расправляли и помещали ее в специальный желоб в термостатируемой камере с протекающим физиологическим солевым раствором (PSS) следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120.4; KCl – 5.9; CaCl<sub>2</sub> – 2.5; MgCl<sub>2</sub> – 1.2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.2; NaHCO<sub>3</sub> – 15.5; глюкоза – 11.5. PSS сатураировали газовой смесью, состоящей из 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Температуру в камере поддерживали на уровне  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Исходный диаметр артерий, выбранных для исследования, составлял 160–330 мкм (второй/третий порядок ветвления от верхней брыжеечной артерии).

В процессе исследования оценивали исходный диаметр артерий, затем осуществляли предконтрактирование посредством введения в омывающий раствор фенилэфрина (ФЭ,  $1 \times 10^{-6}$  М, Sigma-Aldrich, США). К концу второй минуты воздействия ФЭ приводил к максимальной вазоконстрикции, вновь оценивали диаметр артерий и затем в камеру добавляли АХ ( $1 \times 10^{-6}$  М) или НП ( $1 \times 10^{-6}$  М) и вновь проводили измерение диаметра сосудов. В последующем в разных опытах в PSS вводили L-NAME – неселективный ингибитор NO-синтаз ( $1 \times 10^{-5}$  М, Sigma-Aldrich, США) или TRAM-34 – специфический блокатор ИК(Ca) ( $1 \times 10^{-5}$  М, Merck, США) или ODQ – селективный ингибитор NO-чувствительной гуанилатциклазы ( $1 \times 10^{-5}$  М, Sigma-Aldrich, США), через 15 мин добавляли ФЭ и на фоне максимальной вазоконстрикции вводили АХ. Амплитуду дилатации на АХ и НП выражали в % от амплитуды констрикции сосуда на ФЭ.

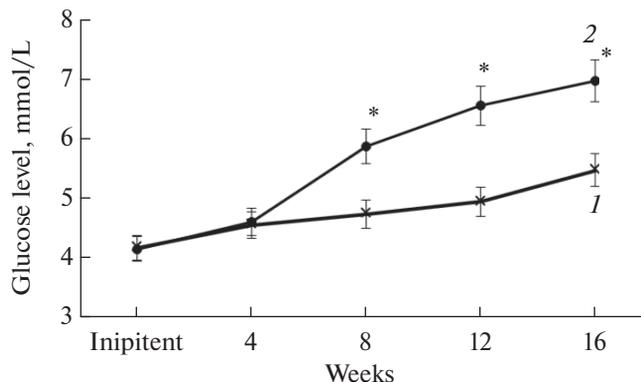
По завершении исследования крыс декапитировали, осуществляли забор крови для определения липидного профиля плазмы (триглицериды (ТГ), холестерин общий (ХС), холестерин-ЛПНП и холестерин-ЛПВП). Биохимический анализ был выполнен на анализаторе ARCHITECT c8000 (США).

При статистической обработке результатов использовали программу Statistica v.12. Полученные данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента. В случае распределения вариант в выборке, отличным от нормального, при исследовании реактивности сосудов брыжейки, при сравнении двух независимых групп, применяли *U*-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлены графики, иллюстрирующие динамику изменения концентрации глюкозы в крови крыс HFgD и крыс контрольной групп. Значимое увеличение уровня глюкозы произошло к 8-й неделе фруктозной диеты и далее уровень глюкозы непрерывно повышался.

В табл. 1 представлены полученные в ходе исследования основные показатели, характеризующие МС. Практически по всем показателям в группах были выявле-



**Рис. 1.** Концентрация глюкозы в крови крыс, получавших фруктозу (2) и крыс контрольной группы (I) на протяжении 16 недель. \* – различия достоверны,  $p < 0.05$ .

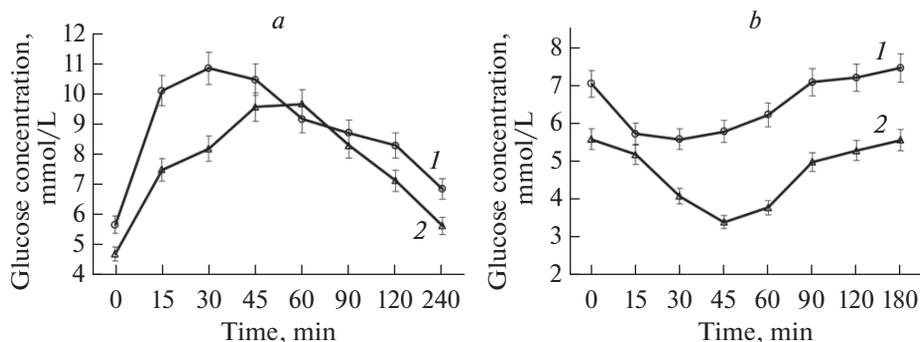
ны достоверные различия. Уровень глюкозы натощак у крыс HFrD был достоверно выше по сравнению с аналогичным показателем у контрольных животных. У крыс HFrD было достоверно повышено артериальное давление, как систолическое, так и диастолическое. Наиболее выраженные изменения наблюдались в липидном спектре: уровень ТГ у крыс HFrD был в 2 раза выше по сравнению с контрольными животными, ХС-ЛПВП – выше в 2.5 раза. Неожиданными оказались результаты сравнения массы тела крыс HFrD и крыс контрольной группы: крысы HFrD имели меньшую массу по сравнению с контрольными.

На рис. 2 представлены графики, иллюстрирующие данные, полученные в ходе проведения глюкозотолерантного теста и теста на инсулинорезистентность. Ана-

**Таблица 1.** Основные показатели, характеризующие метаболический синдром у крыс, получавших фруктозу и крыс контрольной группы

Показатель	Группа, получавшая фруктозную нагрузку (n = 15)	Контрольная группа (n = 11)
Масса, г	382 ± 13*	418 ± 14
Уровень глюкозы в крови натощак, ммоль/л	6.98 ± 0.37*	5.48 ± 0.24
Финальный уровень глюкозы в крови при ГТТ, ммоль/л	7.0 ± 0.4*	5.6 ± 0.1
Финальный уровень глюкозы в крови при тесте на ИР, ммоль/л	7.6 ± 0.3*	5.5 ± 0.5
АД систолическое, мм рт.ст	137 ± 7**	113 ± 6
АД диастолическое, мм рт.ст	93 ± 6*	75 ± 5
ТГ, ммоль/л	1.2 ± 0.2***	0.6 ± 0.2
ХС-ЛПВП, ммоль/л	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
ХС-ЛПНП, ммоль/л	0.4 ± 0.1***	1.03 ± 0.1
ХС, ммоль/л	1.5 ± 0.1*	1.9 ± 0.2

Данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка. ГТТ – глюкозотолерантный тест, ИР – инсулинорезистентность, АД – артериальное давление, ТГ – триглицериды, ХС-ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности, ХС-ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности. Различия по сравнению с контролем достоверны: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .



**Рис. 2.** Тесты на гликемию: *a* – глюкозотолерантный тест, *b* – тест на резистентность к инсулину. 1 – график, отражающий динамику концентрации глюкозы в крови крыс, получавших фруктозу, 2 – график, отражающий динамику концентрации глюкозы в крови крыс контрольной группы.

лиз графиков показывает, что толерантность к глюкозе у крыс HFrD снижена по сравнению с крысами контрольной группы (рис. 2а). Максимальная разница в концентрации глюкозы в крови наблюдалась в первые 15–30 мин после введения глюкозы. Тест на инсулинорезистентность продемонстрировал повышение резистентности к инсулину у крыс HFrD (рис. 2б).

На следующем этапе исследования мы изучили реакции брыжеечных артерий крыс на АХ и НП. Первое, что необходимо отметить, это различия в реакциях артерий на ФЭ: средняя амплитуда ФЭ-индуцированного уменьшения диаметра артерий у крыс HFrD составляла  $136.4 \pm 8.7\%$  (уменьшение диаметра артерий крыс контрольной группы было принято за 100%). Амплитуда дилатации предконтрактированных артерий на АХ в двух группах крыс была разной: у крыс HFrD она составила  $57.3 \pm 4.2\%$  от ФЭ-индуцированного сокращения, а в контрольной группе –  $71.6 \pm 5.5\%$ . Также отличались и реакции артерий на НП: амплитуда дилатации предконтрактированных артерий крыс HFrD составила  $47.4 \pm 2.9\%$ , а артерий крыс контрольной группы –  $63.2 \pm 3.4\%$ .

С целью оценки роли NO в дилатации брыжеечных артерий была проведена серия экспериментов с ингибированием эндотелиальной NO-синтазы. Мы использовали ингибитор NO-синтаз L-NAME. На фоне действия L-NAME амплитуда АХ-индуцированной дилатации брыжеечных артерий значительно уменьшилась: в артериях крыс HFrD дилатация уменьшилась на 36%, а в артериях крыс контрольной группы – на 56%.

С целью изучения роли растворимой гуанилатциклазы гладкомышечных клеток в АХ-индуцированной дилатации артерий мы ингибировали этот фермент посредством добавления в раствор ODQ. На фоне ингибирования растворимой гуанилатциклазы эффект АХ значительно уменьшился (дилатация брыжеечных артерий крыс HFrD составила  $21.6 \pm 1.7\%$ , а артерий крыс контрольной группы –  $11.3 \pm 1.1\%$ ). Применение блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительных  $\text{K}^{+}$ -каналов TRAM-34 также привело к уменьшению амплитуды АХ-индуцированной дилатации брыжеечных артерий, при этом в артериях крыс HFrD ингибиторный эффект TRAM-34 был более выражен (табл. 2).

В табл. 3 представлены данные, полученные в процессе исследования состояния микроциркуляторного русла кожи у крыс HFrD и крыс контрольной группы на 16-й неделе эксперимента. Исходный показатель микроциркуляции кожи животных обеих групп был практически одинаковым. В то же время  $\sigma$ , представляющая со-

**Таблица 2.** Амплитуда АХ- и НП-индуцированной дилатации предконтрактированных артерий брыжейки крыс

	Крысы контрольной группы (n = 7)	Крысы, получавшие фруктозную нагрузку (n = 7)
АХ-индуцированная дилатация, %	71.2 ± 5.5	57.3 ± 4.2*
АХ-индуцированная дилатация на фоне L-NAME, %	15.6 ± 2.1	21.7 ± 2.6*
НП-индуцированная дилатация, %	63.6 ± 4.2	47.4 ± 2.4*
АХ-индуцированная дилатация на фоне ODQ, %	11.3 ± 1.1	21.6 ± 1.7**
АХ-индуцированная дилатация на фоне TRAM-34, %	57.8 ± 3.3	34.2 ± 1.9**

Данные представлены в % от ФЭ – индуцированного сокращения в виде: среднее ± стандартная ошибка. Различия данных в разных группах достоверны \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ .

**Таблица 3.** Показатель микроциркуляции в коже крыс после ионофореза ацетилхолина и нитропрусида натрия

	Исходный показатель микроциркуляции (п. е.)	Показатель микроциркуляции после ионофореза АХ (п. е.)	Показатель микроциркуляции после ионофореза НП (п. е.)
Крысы, получавшие фруктозную нагрузку (n = 15)	7.03 ± 0.31	12.3 ± 0.42	9.73 ± 0.36*
Крысы контрольной группы (n = 11)	7.26 ± 0.29	12.6 ± 0.45	11.0 ± 0.43

Данные представлены в виде: среднее ± стандартная ошибка. \* – достоверно меньше по сравнению с контрольной группой,  $p < 0.05$ .

бой среднее колебание перфузии в исследуемой ткани, у крыс HFrd была достоверно больше ( $0.73 \pm 0.04$  п.е.) по сравнению с крысами контрольной группы ( $0.64 \pm 0.03$  п.е.). Коэффициент вариации в микроциркуляторном русле кожи крыс HFrd составил  $11.2 \pm 0.6\%$ , что было достоверно больше коэффициента вариации в микроциркуляторном русле кожи крыс контрольной группы ( $9.3 \pm 0.4\%$ ). Ионофорез АХ привел к практически одинаковому увеличению показателя микроциркуляции в обеих группах. В то же время результаты пробы с НП значительно отличались, у крыс HFrd прирост показателя микроциркуляции был достоверно меньше.

На основании данных об амплитуде колебаний микрокровотока в разных частотных диапазонах были рассчитаны величины эндотелиального (ЭТ), нейрогенного (НТ) и миогенного тонусов сосудов микроциркуляторного русла кожи крыс (табл. 4). ЭТ в сосудах микроциркуляторного русла кожи крыс HFrd был понижен на 16.1%, НТ повышен на 25.6% по сравнению с аналогичными показателями крыс контрольной группы.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как указывалось во введении, МС представляет собой сложный комплекс метаболических нарушений, как правило, сопровождающихся артериальной гипертензией, приводящей к тяжелым сердечно-сосудистым заболеваниям [1, 2]. МС широко распространен среди взрослого населения [2], а в последние десятилетия все чаще выявляется у детей и подростков [5, 6]. Однако развитие МС у детей и подростков остается спорным вопросом, несмотря на обширные исследования в этой

**Таблица 4.** Компоненты сосудистого тонуса в микроциркуляторном русле кожи крыс

	Крысы контрольной группы ( <i>n</i> = 11)	Крысы, получавшие фруктозную нагрузку ( <i>n</i> = 15)
ЭТ (у. е.)	97 ± 5.4	81 ± 4.7*
НТ (у. е.)	78 ± 4.5	98 ± 5.2*
МТ (у. е.)	47 ± 2.7	51 ± 3.1*

ЭТ – эндотелийзависимый тонус, НТ – нейрогенный тонус, МТ – миогенный тонус. Величины сосудистого тонуса представлены в условных единицах. \* – различия между показателями разных групп достоверны,  $p < 0.05$ .

области [21]. Именно по этой причине в нашем исследовании моделирование МС было начато на крысах в 4-недельном возрасте. Необходимо отметить, что “идеальной модели” для индуцирования МС не существует. Требования к моделям предусматривают, что они должны быть воспроизводимыми, надежными и доступными [22, 23]. Крысы стока Вистар в достаточной степени соответствуют этим требованиям [10]. Мы остановились на диете с достаточно высоким содержанием фруктозы в питьевой воде. Фруктоза оказывает выраженное влияние на метаболизм и важна при моделировании МС, поскольку приводит не только к гипергликемии, но и индуцирует инсулинорезистентность и резистентность к лептину [24].

В нашем наблюдении уже через четыре недели фруктозной нагрузки концентрация глюкозы в крови крыс достоверно повысилась и держалась повышенной на протяжении всего эксперимента. И хотя превышение концентрации глюкозы в крови крыс HFrd было невысоким, были выявлены другие признаки нарушения углеводного обмена: повышенный уровень глюкозы в крови при проведении глюкозотолерантного теста и теста на инсулинорезистентность. Наряду с этими изменениями метаболизма была зарегистрирована выраженная дислипидемия. Со стороны сердечно-сосудистой системы изменения заключались в достоверном повышении систолического и диастолического артериального давления.

Таким образом, несмотря на то, что масса тела крыс HFrd была меньше по сравнению с крысами контрольной группы, гипергликемия, дислипидемия и артериальная гипертензия являются проявлениями МС. Отсутствие ожирения при моделировании МС у крыс встречается довольно часто, диетические вмешательства вызывают только отдельные симптомы МС [25], например, у крыс Sprague Dawley при фруктозной диете развивается инсулинорезистентность, гиперинсулинемия и гипертензия, а масса тела изменяется незначительно [26]. Так же у детей и подростков не всегда гиперинсулинемия и инсулинорезистентность связаны с количеством жировой ткани [27].

В нашей работе основное внимание было уделено изменениям в сердечно-сосудистой системе, развивающимся при моделировании МС. Как уже отмечалось, у крыс HFrd достоверно повышалось систолическое и диастолическое артериальное давление.

Известно, что инсулинорезистентность, характерная для МС, приводит к активации симпатической нервной системы, это важнейший механизм повышения артериального давления [28]. Гипертриглицеридемия, выявленная в нашем исследовании у крыс HFrd, также является важным фактором сердечно-сосудистого риска и еще одним механизмом развития артериальной гипертензии [29]. Одновременно с этими изменениями при МС выявляется эндотелиальная дисфункция [30], выражающаяся, в частности, в снижении продукции эндотелиоцитами вазодилататоров. Неповрежденный эндотелий продуцирует вазодилатирующие факторы: NO, простаглицлин и эндотелиальный гиперполяризующий фактор, тем самым обеспе-

чивая баланс между вазодилатацией и вазоконстрикцией, которые определяют диаметр артерий и, следовательно, артериальное давление [31].

Исследование брыжеечных артерий крыс обеих групп позволило выявить определенные функциональные изменения в артериях крыс HFrD. В частности, констрикция артерий крыс HFrD на фенилэфрин была значительно большей по сравнению с артериями крыс контрольной группы, что, по-видимому, является проявлением повышенной симпатической активации и повышения экспрессии  $\alpha_1$ -адренорецепторов на мембране гладкомышечных клеток артерий, характерной для артериальной гипертензии [32].

Также было установлено снижение амплитуды АХ- и НП-индуцированной дилатации брыжеечных артерий крыс HFrD (на 14 и 16% соответственно). Известно, что неповрежденный эндотелий продуцирует вазодилатирующие факторы, тем самым обеспечивая баланс между вазодилатацией и вазоконстрикцией, которые определяют диаметр артерий и, следовательно, артериальное давление [33]. Уменьшение АХ-индуцированной дилатации свидетельствует о нарушении вазодилатирующей функции эндотелия в артериях крыс HFrD и уменьшении продукции вазодилаторов. Для ответа на вопрос: производство какого вазодилатора было нарушено в наибольшей степени, мы использовали L-NAME, являющийся ингибитором NO-синтаз. На фоне L-NAME амплитуда дилатации в артериях крыс HFrD снизилась на 36%, в то время как в артериях крыс контрольной группы – на 56%. Эти данные свидетельствуют, что NO является важнейшим вазодилатором в брыжеечных артериях крыс и его производство значительно снижено в артериях крыс HFrD.

Изучение вазодилатирующего влияния НП на брыжеечные артерии крыс показало различия в величине НП-опосредованной дилатации в двух группах, амплитуда дилатации артерий крыс HFrD была достоверно меньше. Поскольку НП является экзогенным донором NO и его концентрация в растворе не зависела от состояния эндотелия, следует полагать, что у крыс HFrD нарушены механизмы внутриклеточной сигнализации в гладкомышечных клетках артерий. Для выяснения этого вопроса были проведены эксперименты с ингибированием NO-зависимой растворимой гуанилатциклазы ODQ. Действие ODQ приводило к уменьшению АХ-индуцируемой дилатации в обеих группах крыс, при этом снижение амплитуды дилатации в артериях крыс контрольной группы составило 60%, а в артериях крыс HFrD – 36%. Полученные данные позволяют заключить что в гладкомышечных клетках брыжеечных артерий крыс HFrD наблюдается ингибирование растворимой гуанилатциклазы, что приводит к ослаблению NO-опосредованной дилатации.

Мы также провели эксперименты по выяснению возможной роли эндотелиальной гиперполяризации в АХ-индуцируемой дилатации брыжеечных артерий крыс. С этой целью в раствор вводили TRAM-34 – специфический блокатор  $Ca^{2+}$ -чувствительных  $K^+$ -каналов промежуточной проводимости [34]. На фоне TRAM-34 амплитуда АХ-индуцируемой дилатации артерий уменьшалась: у крыс контрольной группы – на 14%, а у крыс HFrD – на 23%. Результаты этих экспериментов позволяют сделать два заключения: 1 – в брыжеечных артериях крыс Вистар функционирует механизм дилатации, заключающийся в эндотелиальной гиперполяризации, обусловленной активацией  $Ca^{2+}$ -чувствительных  $K^+$ -каналов промежуточной проводимости; 2 – в эндотелиальных клетках артерий крыс HFrD в процессе развития МС и снижения продукции/биодоступности NO компенсаторно возрастает роль эндотелиальной гиперполяризации, что часто наблюдается и при других видах патологии, сопровождающихся повреждением эндотелия [35].

Исследование состояния сосудов микроциркуляторного русла кожи крыс HFrD, проведенное методом ЛДФ, показало незначительное уменьшение перфузии кожи

по сравнению с крысами контрольной группы. В микрососудах кожи крыс HFrD было зарегистрировано увеличение нейрогенного тонуса, что является подтверждением повышения у них симпатической активности (табл. 3). При этом повышение симпатической активности не привело к ограничению кровотока в микрососудах кожи. Это может быть связано с нивелированием эндотелием избыточной вазоконстрикции микрососудов кожи, вызванной повышенной активностью симпатической нервной системы у крыс HFrD посредством усиления продукции вазодилататоров (эндотелиального гиперполяризующего фактора), что подтверждается зарегистрированным ослаблением эндотелиального тонуса сосудов микроциркуляторного русла у крыс HFrD (табл. 3) [20].

Одинаковое увеличение показателя микроциркуляции в коже крыс обеих групп после ионофореза АХ свидетельствует о способности эндотелия микрососудов кожи крыс обеих групп продуцировать достаточное количество вазодилататоров (АХ-индуцированный прирост показателя микроциркуляции составил в обеих группах 65–67%). В то же время данные о величинах показателя микроциркуляции кожи после ионофореза НР (в контрольной группе прирост этого показателя составил 52%, а у крыс HFrD – лишь 30%) показывают, что механизмы увеличения микрокровотока в коже в разных группах крыс существенно отличаются. Если у контрольных крыс увеличение показателя микроциркуляции было опосредовано усилением продукции NO, то у крыс HFrD NO обеспечивал меньшую дилатацию. По-видимому, выраженная дилатация микрососудов в коже крыс HFrD при ионофорезе АХ так же, как и в брыжеечных артериях, обусловлена возрастанием продукции эндотелиального гиперполяризующего фактора (основанием для подобного предположения являются данные о повышении роли эндотелий-зависимой гиперполяризации в брыжеечных артериях крыс HFrD).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами изучены ранние изменения в сердечно-сосудистой системе молодых крыс при моделировании МС с применением фруктозной нагрузки. Установлено, что несмотря на некоторое снижение массы тела у крыс, находившихся на фруктозной диете, по сравнению с крысами контрольной группы, у этих животных были выявлены признаки МС: гипергликемия, инсулинорезистентность, дислипидемия, повышение активности симпатической нервной системы и артериальная гипертензия. Изменения со стороны брыжеечных артерий заключались в повышении реактивности на ФЭ и ослаблении АХ-индуцированной дилатации, что объясняется снижением продукции эндотелием NO. При этом было установлено, что в этих артериях повышается продукция эндотелиального гиперполяризующего фактора, компенсирующего в определенной степени дефицит NO. Изменения в гладкомышечных клетках артерий заключались в ослаблении эффективности NO-опосредованной сигнализации: было выявлено ингибирование растворимой гуанилатциклазы. В микроциркуляторном русле кожи крыс, получавших фруктозную нагрузку, перфузия сохранялась на уровне, характерном для крыс контрольной группы, при этом было обнаружено повышение нейрогенного тонуса и ослабление эндотелий-зависимого тонуса микрососудов кожи. Показано также уменьшение продукции NO в сосудах микроциркуляторного русла, которое компенсируется производством эндотелием других вазодилатирующих факторов.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов относительно публикации данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Г.И.Л. — идея работы и планирование эксперимента, редактирование; И.А.Ц. и Г.Т.И. — обзор литературы, исследование, анализ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saklayen MG* (2018) The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep* 20 (2): 12.  
<https://doi.org/doi:10.1007/s11906-018-0812-z>
2. *Ротарь ОП, Либис РА, Исаева ЕН, Ерина АМ, Шавшин ДА, Могучая ЕВ, Колесова ЕП, Бояринова МА, Морошкина НВ, Яковлева ОИ, Солнцев ВН, Конради АО, Шляхто ЕВ* (2012) Распространенность метаболического синдрома в разных городах РФ. *Рос кардиол журн* (2): 55–62. [*Rotar OP, Libis RA, Isaeva EN, Erina AM, Shavshin DA, Moguchaya EV, Kolesova EP, Boyarinova MA, Moroshkina NV, Yakovleva OI, Solntsev VN, Konradi AO, Shlyakhto EV* (2012) Metabolic syndrome prevalence in russian cities. *Russ J Cardiol* (2): 55–62. (In Russ)].
3. *Lopez-Candales A, Hernández Burgos PM, Hernandez-Suarez DF, Harris D* (2017) Linking Chronic Inflammation with Cardiovascular Disease: From Normal Aging to the Metabolic Syndrome. *J Nat Sci* 3(4): e341.
4. *Bovolini A, Garcia J, Andrade MA, Duarte JA* (2021) Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *Int J Sports Med* 42(3): 199–214.  
<https://doi.org/10.1055/a-1263-0898>
5. *Lee AM, Gurka MJ, DeBoer MD* (2016) Trends in Metabolic Syndrome Severity and Lifestyle Factors Among Adolescents. *Pediatrics* 137(3): e20153177.  
<https://doi.org/10.1542/peds.2015-3177>
6. *DeBoer MD* (2019) Assessing and Managing the Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *Nutrients* 11(8): 1788.  
<https://doi.org/10.3390/nu11081788>
7. *Samson SL, Garber AJ* (2018) Metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 43(1): 1–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.09.009>
8. *Fuchs T, Loureiro MP, Macedo LE, Nocca D, Nedelcu M, Costa-Casagrande TA* (2018) Animal models in metabolic syndrome. *Rev Col Bras Circ* 45(5): e1975.  
<https://doi.org/10.1590/0100-6991e-20181975>
9. *Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO Tang-Christensen M* (2012) Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin* 33(2): 173–181.  
<https://doi.org/10.1038/aps.2011.203>
10. *Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM* (2004) Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 20(2): 218–224.  
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2003.10.008>
11. *Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S* (2016) Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)* 13: 65.  
<https://doi.org/10.1186/s12986-016-0123-9>
12. *Sato Mito N, Suzui M, Yoshino H, Kaburagi T, Sato K* (2009) Long term effects of high fat and sucrose diets on obesity and lymphocyte proliferation in mice. *J Nutr Health Aging* 13(7): 602–606.  
<https://doi.org/10.1007/s12603-009-0170-2>
13. *Aydin S, Aksoy A, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Kuloglu T, Citil C, Catak Z* (2014) Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition* 30(1): 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.05.013>
14. *Basciano H, Federico L, Adeli K* (2005) Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2(1): 5.  
<https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-5>
15. *Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sanchez-Lozada LG* (2007) Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J*

- Clin Nutr 86(4): 899–906.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/86.4.899>
16. *Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A, Bautista P, Cristóbal M, Nepomuceno T, Soto V, Avila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M* (2007) Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(1): F423–F429.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00124.2006>
  17. *Kotsis V, Jordan J, Micic D, Finer N, Leitner DR, Toplak H, Tokgozoglu L, Athyros V, Elisaf M, Filippatos TD, Redon J, Redon P, Antza C, Tsioufis K, Grassi G, Seravalle G, Coca A, Sierra C, Lurbe E, Stabouli S, Jelakovic B, Nilsson PM* (2018) Obesity and cardiovascular risk: a call for action from the European Society of Hypertension Working Group of Obesity, Diabetes and the High-risk Patient and European Association for the Study of Obesity: part A: mechanisms of obesity induced hypertension, diabetes and dyslipidemia and practice guidelines for treatment. *J Hypertens* 36(7): 1427–1440.  
<https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001730>
  18. *Tzjomalos K, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP* (2010) Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20(2): 140–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.08.006>
  19. *Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ* (2007) Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115(10): 1285–1295.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>
  20. *Крупаткин АИ, Сидоров ВВ* (2005) Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови. М. Медицина. [Krupatkin AI, Sidorov VV (2005) Laser Doppler flowmetry of blood microcirculation. M. Medicine. (In Russ)].
  21. *Serbis A, Giapros V, Galli-Tsinopoulou A, Siomou E* (2020) Metabolic Syndrome in Children and Adolescents: Is There a Universally Accepted Definition? Does it Matter? *Metab Syndr Relat Disord* 18(10): 462–470.  
<https://doi.org/10.1089/met.2020.0076>
  22. *Rohman M, Lukitasari M, Nugroho D, Nashi W, Nugraheini N, Sardjono T* (2017) Development of an Experimental Model of Metabolic Syndrome in Sprague Dawley Rat. *Res J Life Sci* 4(1): 76–86.  
<https://doi.org/10.21776/ub.rjls.2017.004.01.10>
  23. *Moreno-Fernández S, Garcés-Rimón M, Vera G, Astier J, Landrier JF, Miguel M* (2018) High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. *Nutrients* 10(10): 1502.  
<https://doi.org/10.3390/nu10101502>
  24. *Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA* (2012) Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur J Nutr* 51(4): 445–454.  
<https://doi.org/10.1007/s00394-011-0228-x>
  25. *Bertram CE, Hanson MA* (2001) Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull* 60: 103–121.  
<https://doi.org/10.1093/bmb/60.1.103>
  26. *Oron-Herman M, Kamari Y, Grossman E, Yeger G, Peleg E, Shabtay Z, Shamiss A, Sharabi Y* (2008) Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens* 21(9): 1018–1022.  
<https://doi.org/10.1038/ajh.2008.218>
  27. *Litwin M, Kułaga Z* (2021) Obesity, metabolic syndrome, and primary hypertension. *Pediatr Nephrol* 36(4): 825–837.  
<https://doi.org/10.1007/s00467-020-04579-3>
  28. *da Silva AA, do Carmo JM, Li X, Wang Z, Mouton AJ, Hall JE* (2020) Role of Hyperinsulinemia and Insulin Resistance in Hypertension: Metabolic Syndrome Revisited. *Can J Cardiol* 36(5): 671–682.  
<https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.02.066>
  29. *Hert KA, Fisk PS 2nd, Rhee YS, Brunt AR* (2014) Decreased consumption of sugar-sweetened beverages improved selected biomarkers of chronic disease risk among US adults: 1999 to 2010. *Nutr Res* 34(1): 58–65.  
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.10.005>
  30. *Tzjomalos K, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP* (2010) Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20(2): 140–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.08.006>
  31. *Spieker LE, Noll G, Ruschitzka FT, Maier W, Lüscher TF* (2000) Working under pressure: the vascular endothelium in arterial hypertension. *J Hum Hypertens* 14(10–11): 617–630.  
<https://doi.org/doi:10.1038/sj.jhh.1001012>

32. *Clements ML, Banas AJ, Faber JE* (1997) Effect of mechanical loading on vascular alpha 1D- and alpha 1B-adrenergic receptor expression. *Hypertension* 29(5): 1156–1164. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.29.5.1156>
33. *Féléto M, Köhler R, Vanhoutte PM* (2012) Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses. *Ann Med* 44(7): 694–716. <https://doi.org/10.3109/07853890.2011.585658>
34. *Li JC, Velagic A, Qin CX, Li M, Leo CH, Kemp-Harper BK, Ritchie RH, Woodman OL* (2021) Diabetes Attenuates the Contribution of Endogenous Nitric Oxide but Not Nitroxyl to Endothelium Dependent Relaxation of Rat Carotid Arteries. *Front Pharmacol* 21(11): 585740. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.585740>
35. *Yada T, Shimokawa H, Tachibana H* (2018) Endothelium-dependent hyperpolarization-mediated vasodilatation compensates nitric oxide-mediated endothelial dysfunction during ischemia in diabetes-induced canine coronary collateral microcirculation *in vivo*. *Microcirculation* 25(5): e12456. <https://doi.org/10.1111/micc.12456>

### **Early Changes in the Functional State of the Arteries and Vessels of the Microcirculatory Bed in Modeling the Metabolic Syndrome**

**I. A. Tsareva<sup>a</sup>, \*, G. T. Ivanova<sup>a</sup>, and G. I. Lobov<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology RAS, Saint-Petersburg, Russia*

*\*e-mail: innatsareva@yandex.ru*

Early changes in the cardiovascular system of young Wistar rats were studied in modeling the metabolic syndrome using a fructose load. It was found that despite some weight loss in rats on a fructose diet, compared with rats in the control group, these animals showed signs of the metabolic syndrome: hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, increased activity of the sympathetic nervous system and arterial hypertension. Changes in the mesenteric arteries included an increase in reactivity to phenylephrine and a decrease in acetylcholine-induced dilatation, which is explained by a decrease in NO production by the endothelium, which is to a certain extent compensated by an increase in the production of endothelial hyperpolarizing factor, which realizes its effect through the activation of Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup>-channels of intermediate conduction. Changes in rat arterial smooth muscle cells induced by fructose loading consisted of inhibition of soluble guanylate cyclase. In the MCR skin of rats that received a fructose load, perfusion remained at the level characteristic of rats in the control group, while an increase in neurogenic tone and a weakening of the endothelium-dependent tone of skin microvessels were found. A decrease in NO production in the MCR vessels was also shown, which is compensated by the production of other vasodilating factors by the endothelium.

**Keywords:** metabolic syndrome, laser Doppler flowmetry (LDF), endothelial dysfunction, fructose load

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**УЧАСТИЕ iNOS В ФОРМИРОВАНИИ ТОНУСА ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ И СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС, СОДЕРЖАЩИХСЯ НА ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЕ**

© 2022 г. И. Б. Соколова\*

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия**\*E-mail: SokolovaIB@infran.ru*

Поступила в редакцию 14.06.2022 г.

После доработки 19.07.2022 г.

Принята к публикации 30.07.2022 г.

Изучали изменения опосредованной ацетилхолином (ACh) дилатации пиальных артерий сенсомоторной коры головного мозга у крыс Sprague Dawley после формирования у них метаболических и гормональных нарушений, сходных с сахарным диабетом 2-го типа. Для этого крыс 2 мес. содержали на высокожировой диете (ВЖД), а затем части животных вводили низкую дозу стрептозотоцина (35 мг/кг). Еще 1 мес. все животные получали корм с повышенным содержанием жира. С использованием метода прижизненной микрофотосъемки оценивали реакции пиальных артерий на воздействие одного ACh ( $10^{-7}$  М) и ACh на фоне действия неселективного блокатора NO-синтазы L-NAME и на воздействие селективного блокатора индуцибельной NO-синтазы (iNOS) аминогуанидина (AG). Установлено, что потребление высокожирового корма на протяжении 3 мес. (группа ВЖД) привело к развитию эндотелиальной дисфункции в пиальных артериях сенсомоторной коры головного мозга: число расширившихся на воздействие ACh сосудов было меньше в 1.2–1.6 раз, чем в контрольной группе. ACh-зависимая дилатация определялась реакциями с участием eNOS только в артериях диаметром менее 40 мкм. У крыс, находящихся на ВЖД, в церебральных артериях не выявили наличие iNOS. У животных, которым моделировали сахарный диабет 2-го типа (СД2) также имела место эндотелиальная дисфункция в церебральных артериях: число расширившихся на воздействие ACh сосудов было меньше в 1.6–2.3, чем в контроле. При этом сигнальный каскад с участием eNOS не контролировал реактивность артерий. Поддержание сосудистого тонуса в основном происходило за счет реакций с участием iNOS. Основные нарушения в дилататорной реакции у крыс с СД2 – наименьшее число расширившихся на воздействие ACh сосудов со значительным уменьшением степени дилатации (в 1.5–1.6 раза относительно контроля), отсутствие блокировки ACh-опосредованной дилатации на фоне L-NAME, наибольшее число констрикций при воздействии AG (60–70% от всех исследованных сосудов) – были выявлены в пиальных артериях диаметром менее 40 мкм, т.е. именно в том звене сосудистой сети, которое принимает максимальное участие в газообмене между кровью и тканью.

*Ключевые слова:* высокожировая диета, сахарный диабет 2-го типа, пиальные артерии, дисфункция эндотелия, эндотелиальная и индуцибельная NO-синтазы, ацетилхолин, дилатация

Механизмы ремоделирования сосудистого русла при метаболическом синдроме и сахарном диабете 2-го типа (СД2) к настоящему времени остаются малоизученными. Для метаболического синдрома и СД2 характерна инсулинорезистентность, а для СД2 – хроническая гипергликемия. Инсулинорезистентность развивается при нарушении обмена веществ и значительном накоплении в организме висцерального жира [1] и рассматривается как основной патогенетический механизм развития СД2 [2]. Инсулин в высокой концентрации оказывает прямое атерогенное действие на стенки сосудов, вызывая пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток, пролиферацию фибробластов, активацию системы свертывания крови, снижение активности фибринолиза [3]. В последние годы инсулинорезистентность связывают с накоплением в ткани и сосудах головного мозга  $\beta$ -амилоидного белка. Отложение  $\beta$ -амилоида было зафиксировано в стенках лептоменингеальных и кортикальных артерий, что привело к развитию воспалительной реакции как в сосудистой стенке, так и в окружающей сосудах ткани [4]. При хронической гипергликемии глюкоза вступает во взаимодействие с белками и липидами крови с образованием продуктов гликозилирования [5]. Эти соединения токсичны для клеток эндотелия сосудов. Повреждение эндотелиоцитов ведет к развитию эндотелиальной дисфункции: нарушению баланса выработки вазодилаторов/вазоконстрикторов, повышенному тромбообразованию, активации процессов воспаления [6]. При развитии тканевого воспаления экспрессируется значительное количество индуцибельной NO-синтазы (iNOS). iNOS продуцирует огромные (в 100–1000 раз больше, чем эндотелиальная и нейрональная NOS) количества NO. Поскольку высокие дозы NO токсичны для клеток, эта изоформа фермента считается патологической в отличие от конститутивной [7]. iNOS следует рассматривать как важную терапевтическую мишень, воздействуя на которую можно уменьшить ремоделирование и деградацию церебрального сосудистого русла у больных с метаболическим синдромом и СД2.

Цель представленного исследования выяснить на какой стадии нарушения метаболизма и в каких церебральных артериях (крупных, мелких) iNOS принимает участие в формировании сосудистого тонуса.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на самцах крыс Sprague Dawley ( $n = 30$ ) из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН”. Работа выполнена в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, принятыми Европейской конвенцией 19.07.2014 г. и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в отсутствие искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

В начале работы возраст крыс составлял 3 месяца, масса тела 300–350 г. Контрольные крысы (Группа 1,  $n = 10$ ) содержались в условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и стандартному пищевому рациону. Крысы, содержащиеся на высокожировой диете (ВЖД) (Группа 2,  $n = 10$ ) и крысы, у которых моделировали сахарный диабет 2-го типа (СД2) (Группа 3,  $n = 10$ ) в течение 2 мес. получали корм с повышенным содержанием жира. ВЖД включала в себя комбикорм (370 г/кг), жир свиной (313 г/кг), казеин (253 г/кг), витаминно-минеральную смесь (61 г/кг) – 58% жира, 25% белка, 17% углеводов от общего количества калорий [8, 9]. Через 2 мес. крысам из группы 3 внутривенно был введен панкреотоксичный препарат стрептозотоцина в низкой концентрации (35 мг/кг) (Sigma-Aldrich, США). Еще 1 месяц животные из групп 2 и 3 получали ВЖД. Раз в

месяц у всех животных проводили забот крови из хвостовой вены для регистрации уровня глюкозы с помощью глюкометра Акку-Чек Актив (“Рош Диабетс Кеа ГМБХ”, Германия). Через 3 мес. крысы из всех 3 групп прошли тесты на инсулинорезистентность и толерантность к глюкозе.

Все последующие хирургические и экспериментальные действия были проведены на наркотизированных (золетил, Virbac, Франция, 20 мг/кг, внутривенно) крысах; эвтаназия проведена путем введения увеличенной дозы наркоза. Перед началом эксперимента у крыс измеряли уровень глюкозы в крови из хвостовой вены, массу тела, длину от кончика носа до анального отверстия, обхват живота. После эвтаназии у животных тщательно изымали висцеральный жир и определяли его вес. Висцеральная жировая ткань у грызунов включает в себя мезентериальную (располагается по ходу кишечника), забрюшинную (располагается за почками) и эпидимальную (располагается вдоль семенников) жировую ткань [10].

В теменной области черепа животного высверливали отверстие ( $S \approx 1 \text{ см}^2$ ), твердую мозговую оболочку в пределах отверстия удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl 120.4; KCl 5.9; NaHCO<sub>3</sub> 15.5; MgCl<sub>2</sub> 1.2; CaCl<sub>2</sub> 2.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; глюкоза 11.5; pH 7.4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента содержался в медицинском водяном термостате (TW-2, SIA “ELMI”, Латвия) при температуре 37°C. На протяжении всего эксперимента контролировали среднее артериальное давление, показатели которого в течение всего эксперимента оставались примерно на одном уровне. Прямое измерение артериального давления производили через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур, <https://www.argonmedical.com>), подключенным к АЦП, входящему в состав микроконтроллера фирмы STMicroelectronics (США), выход которого был подключен к компьютеру через порт USB. Для работы устройства с компьютером в нашей лаборатории была разработана оригинальная программа визуализации значений артериального давления. Расчет среднего артериального давления в реальном времени производился программой по классической формуле:

$$P_{\text{cp}} = P_{\text{д}} + 1/3(P_{\text{с}} - P_{\text{д}}),$$

где  $P_{\text{cp}}$  – среднее артериальное давление (мм рт. ст.),  $P_{\text{с}}$  – систолическое давление (мм рт. ст.),  $P_{\text{д}}$  – диастолическое давление (мм рт. ст.).

Температуру тела животного поддерживали на уровне 38°C. Контроль за ректальной температурой осуществлялся с помощью лабораторного термометра ТТЖ-М, (ОАО “Стеклоприбор”, Украина).

Визуализацию пиальных артерий проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (“Микромед”, Россия), цветную камеру – видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scopetek, Китай) и персональный компьютер. На статических изображениях с помощью компьютерной программы для цитофотометрии “Photo M” (авторская разработка А. Черниговского, [http://www.t\\_lambda.chat.ru](http://www.t_lambda.chat.ru)) определяли количество артерий и общее количество микрососудов на определенной площади. Затем измеряли диаметры пиальных артерий. В ходе эксперимента у каждого животного было исследовано более 40 пиальных артерий. Диаметры артерий измеряли в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса и при орошении мозга раствором ацетилхолина (ACh) ( $10^{-7}$  М) (Sigma-Aldrich, США). Все исследованные пиальные артерии были разбиты на группы в соответствии с исходным диаметром: 60–80, 40–60, 20–40, менее 20 мкм. О результатах воздействия

ACh судили по количеству расширившихся сосудов и по степени их расширения. Степень дилатации ДД оценивали как разность между значениями диаметра после (Д2) и до (Д1) воздействия ACh относительно диаметра сосуда Д1 перед воздействием ACh, %:  $\Delta D = (D_2 - D_1)/D_1 \times 100$ . Изменения диаметра пиальной артерии в течение 20 мин при орошении поверхности мозга раствором Кребса составляют  $\pm 5\%$ , поэтому считали, что реакция на воздействие отсутствует, если  $\Delta D$  не превышает 5% [11].

Последующий ход эксперимента: поверхность головного мозга в течение 20 мин отмывали от ACh раствором Кребса. Затем на 5 мин на пиальную оболочку наносили раствор неселективного блокатора NO-синтазы L-NAME (N( $\omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester, Sigma-Aldrich, 100 мкМ), а затем на фоне действия L-NAME наносили ACh. В другой серии экспериментов вместо L-NAME наносили раствор аминоксидина (Aminoguanidine hydrochloride, Sigma-Aldrich,  $10^{-3}$  М), являющегося селективным ингибитором iNOS. Далее проводили описанные выше измерения.

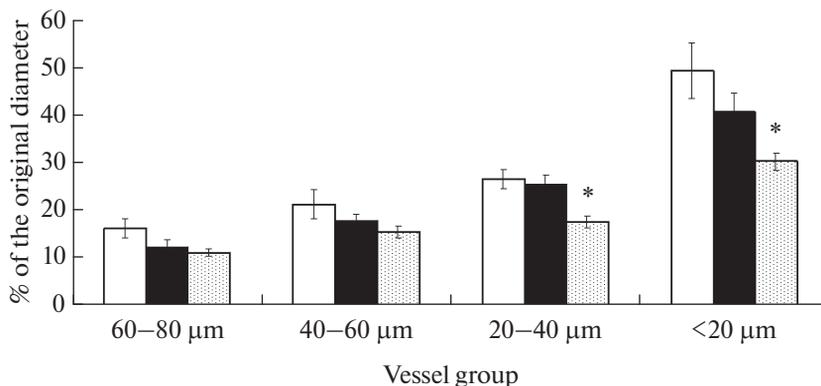
Математическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 ("GraphPad Software Inc.", США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариантов в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ( $p < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования показали, что потребление высокожирового корма на протяжении 3 мес. (Группа 2, ВЖД) привело к значительному повышению удельного веса висцерального жира ( $4.41 \pm 0.42\%$  против  $2.28 \pm 0.25\%$  в контроле,  $p \leq 0.05$ ), достоверному относительно контрольной группы повышению уровня глюкозы в крови ( $10.8 \pm 0.8$  ммоль/л относительно  $5.6 \pm 0.1$  ммоль/л,  $p \leq 0.001$ ), развитию инсулинорезистентности (площадь под кривой "концентрация глюкозы в крови—время (120 мин)" была на 14% больше, чем у контрольных крыс). При этом тест на толерантность к глюкозе не выявил статистически значимой разницы между площадью под кривой "концентрация глюкозы в крови—время (120 мин)" у контрольных и ВЖД крыс, содержащихся на ВЖД. Применение панкреотоксичного препарата стрептозотоцина на фоне ВЖД (Группа 3, СД2) привело к подъему уровня глюкозы в среднем до  $16 \pm 0.9$  ммоль/л ( $p \leq 0.001$ ), формированию у животных инсулинорезистентности и толерантности к глюкозе (площадь под кривой "концентрация глюкозы в крови—время (120 мин)" была соответственно на 223 и 101% больше, чем у контрольных крыс, повышению удельного веса висцерального жира до  $5.32 \pm 0.24\%$  ( $p \leq 0.001$ ). Среднее артериальное давление у крыс ВЖД и СД2 составляло  $125.7 \pm 2$  и  $128.5 \pm 1.9$  мм рт. ст. соответственно.

ВЖД (Группа 2) привела к статистически значимому уменьшению числа пиальных артериальных сосудов, ответивших увеличением диаметра на воздействие ACh (табл. 1) — в среднем в 1.2–1.6 раза в зависимости от диаметра сосудов. У крыс с СД2 количество дилатирующих на ACh артерий было значительно меньше, чем у контрольных животных (Группа 1) (в среднем в 1.6–2.3 раза) и чем у крыс ВЖД (Группа 2) (в среднем в 1.2–1.9 раза).

У крыс ВЖД степень расширения пиальных артерий под воздействием ACh была примерно такой же, как и у животных из контрольной группы (рис. 1). В группе СД2 наблюдали статистически значимое уменьшение степени расширения артерий по сравнению с контролем у мелких сосудов (исходный диаметр менее 40 мкм).



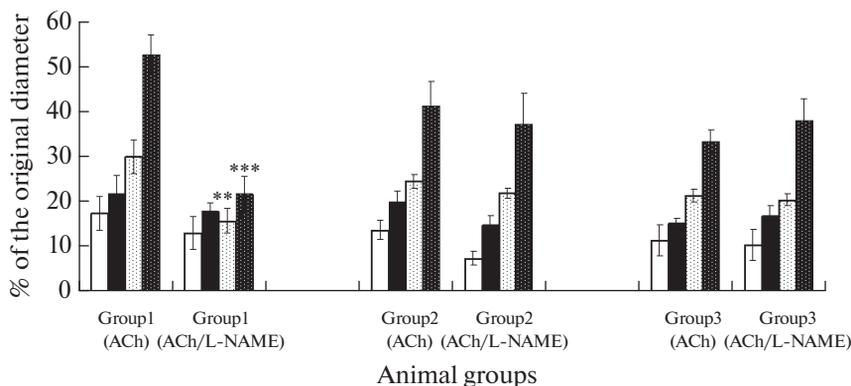
**Рис. 1.** Дилататорная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие АСh: – степень расширения сосудов (% от исходного диаметра). Светлая заливка – контрольные животные (Группа 1); темная заливка – животные ВЖД (Группа 2), штриховка – животные с СД2 (Группа 3). По оси абсцисс – группы сосудов разного диаметра; по оси ординат – степень расширения артерий на воздействие АСh (%) относительно исходного диаметра, который был принят за 100%. Изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных (\*  $p < 0.05$ , критерий Тьюки).

Число расширившихся пиальных артерий на АСh на фоне действия неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME в контрольной группе было снижено в 3–4 раза по сравнению с воздействием одного АСh, исключая самые крупные сосуды (табл. 1). У животных ВЖД статистически значимая разница между этими показателями была выявлена у сосудов диаметром менее 40 мкм. У животных с СД2 не наблюдали статистически значимой разницы между числом расширившихся артерий под воздействием только АСh и АСh на фоне L-NAME (за исключением артерий с исходным диаметром 60–80 мкм). В контрольной группе степень расширения пиальных артерий на воздействие АСh на фоне L-NAME по

**Таблица 1.** Число расширившихся пиальных артерий под воздействием АСh, АСh на фоне действия L-NAME и АСh на фоне действия амингуанидина в разных группах экспериментальных животных

Группа животных	Воздействие	Число расширившихся артерий, %			
		60–80 мкм	40–60 мкм	20–40 мкм	≤ 20 мкм
Группа 1 контроль	АСh	46.4 ± 3.9	55.2 ± 2.8	64.7 ± 2.5	80.2 ± 2.3
	АСh/L-NAME	26 ± 6.7	18.7 ± 2.4***	22.3 ± 2***	20 ± 3.2***
Группа 2 ВЖД	АСh	34.1 ± 4.4*	39.7 ± 3.9**	52.5 ± 1.9***	50.7 ± 4.4***
	АСh/L-NAME	22 ± 6.3	28.4 ± 5.9	29.4 ± 1.7*	21 ± 11.3*
Группа 3 СД2	АСh	29.4 ± 5.3*	29.2 ± 3.9**	28.7 ± 4.3***	34.5 ± 4.7***
	АСh/L-NAME	10.6 ± 2.9*	24 ± 7.2	29.2 ± 6.2	33.6 ± 5.6

\* – Изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , критерий Тьюки). • – Изменения значимы по сравнению с числом расширений на воздействие АСh в этой же группе животных у артерий такого же диаметра (• $p < 0.05$ , •• $p < 0.001$ , критерий Тьюки).



**Рис. 2.** Дилататорная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие ACh на фоне действия неселективного блокатора NO-синтазы L-NAME: — степень расширения сосудов (% от исходного диаметра). Светлая заливка — артерии диаметром 60–80 мкм, темная заливка — артерии диаметром 40–60 мкм, темная штриховка на светлом фоне — артерии диаметром 20–40 мкм, светлая штриховка на темном фоне — артерии диаметром менее 20 мкм.

По оси абсцисс — группы сосудов разного диаметра: группа 1 — контрольные животные; группа 2 — животные ВЖД; группа 3 — животные с СД2.

По оси ординат — степень расширения артерий на воздействие ACh и ACh на фоне L-NAME (%). Изменения значимы для артерий одинакового диаметра из одной и той же группы животных (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , критерий Тьюки).

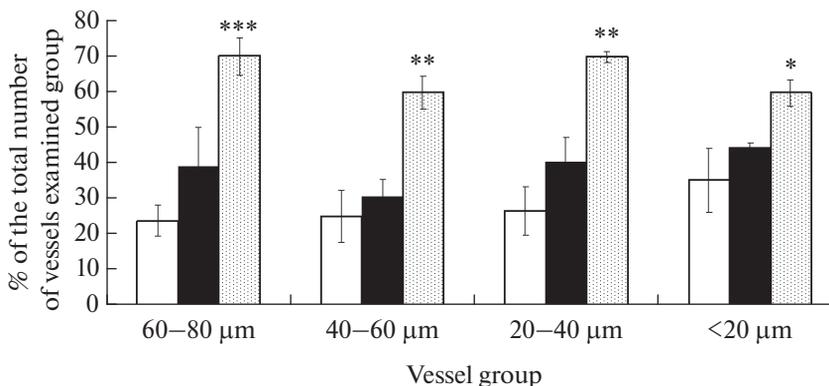
сравнению с действием одного ACh статистически значимо уменьшалась у сосудов с исходным диаметром менее 40 мкм (рис. 2). У животных ВЖД и СД2 все исследованные артерии расширялись примерно одинаково и на один ACh и на ACh на фоне действия L-NAME.

Рис. 3 иллюстрирует влияние селективного блокатора индуцибельной NO-синтазы аминуганидина на пиальные артерии у животных из экспериментальных групп. Под воздействием аминуганидина у контрольных животных уменьшается диаметр примерно 1/3 всех исследованных пиальных артерий. Примерно такое же число сузившихся сосудов и в группе ВЖД. У крыс с развившемся СД2 число констрикций на аминуганидин резко возрастает и достигает 60–70%.

Аминуганидин не влияет на ACh-зависимую дилататорную реакцию пиальных артерий у животных из всех экспериментальных групп.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

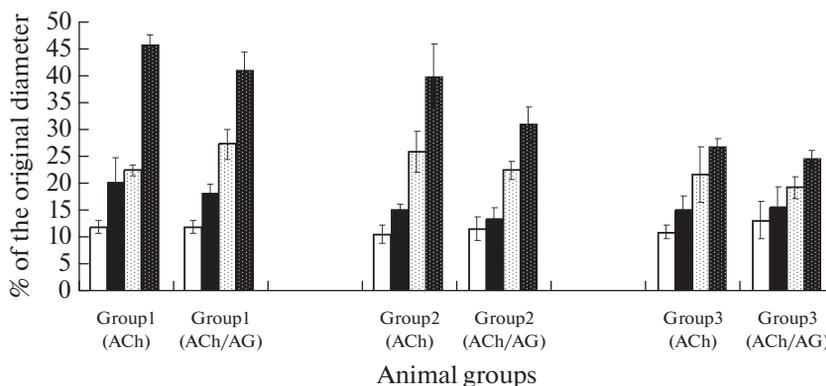
К настоящему времени патогенез сосудистых осложнений СД2 в головном мозге остается до конца не решенной проблемой. Основная роль в развитии диабетических ангиопатий отводится эндотелиальной дисфункции, которая приводит к нарушению регуляции сосудистого тонуса и ауторегуляции мозгового кровотока [12]. К эндотелиальной дисфункции ведет инсулинорезистентность, характерная и для МС и для СД2. В норме инсулин активирует фосфатил-инозитол-3-киназу в эндотелиальных клетках мелких сосудов, что приводит к экспрессии гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и высвобождению NO — инсулин-обусловленная вазодилатация [13]. Избыточный инсулин активирует митогенактивируемую протеинкиназу, которая, в свою очередь, стимулирует выработку различных ростовых факторов, запускающих пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток в стенке артерий [14]. Это приводит к повышению сосудистого тонуса и ремоделированию церебральной сосудистой системы.



**Рис. 3.** Констрикторная реакция пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие аминоксантина: — число констрикций (% от общего числа исследованных сосудов). Светлая заливка — контрольные животные (Группа 1); темная заливка — животные ВЖД (Группа 2), штриховка — животные с СД2 (Группа 3). По оси абсцисс — группы сосудов разного диаметра; по оси ординат — число сузившихся на воздействие аминоксантина артерий относительно общего числа сосудов в группе (%). Изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у контрольных животных (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , критерий Тьюки).

В представленном исследовании нахождение на ВЖД и развитие СД2 у крыс привело к угнетению ACh-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов (табл. 1): по сравнению с контролем у животных из Группы 2 (ВЖД) в среднем в 1.2–1.6 раза, в зависимости от диаметра сосудов, уменьшилось число дилатаций при аппликации на поверхность головного мозга ACh; в Группе 3 (СД2) — в среднем в 1.6–2.3 раза. Полученные данные подтверждают, что повреждение клеток интимы в церебральных артериях и развитие эндотелиальной дисфункции происходит и при метаболических нарушениях (ВЖД) [15] и при более серьезных гормональных патологиях (СД2) [16]. При этом в большей мере страдают мелкие артерии диаметром менее 40 мкм, у которых уменьшается и число дилатаций и степень расширения сосудов (рис. 1).

В нормальных условиях ACh, связываясь с мускариновыми рецепторами эндотелиальных клеток, запускает реакцию окисления аминокислоты L-аргинина с образованием NO и L-цитрулина. Катализатором данного процесса выступает eNOS. Применение блокатора NOS L-NAME у контрольных животных привело к уменьшению числа дилатирующих на воздействие ACh артерий в 2–4 раза (табл. 1) и уменьшению степени расширения сосудов с исходным диаметром 20–40 мкм и менее 20 мкм на 11 и 20% соответственно (рис. 2). В группе животных ВЖД статистически значимое уменьшение числа дилатаций на ACh на фоне действия L-NAME было отмечено у сосудов диаметром менее 40 мкм (табл. 1). У более крупных артерий число дилатаций статистически значимо не изменялось, как не изменялась и степень расширения всех исследованных сосудов у крыс ВЖД. Это свидетельствует о незначительной роли каскада L-аргинина/eNOS/NO в сосудистой регуляции пиальных артерий. У крыс с СД2 применение L-NAME не вызвало статистически значимых изменений в ACh-опосредованной дилатации ни по числу расширившихся артерий (табл. 1), ни по степени их расширения (рис. 2). Отсутствие реакции на воздействие L-NAME объяснить достаточно сложно, хотя такие экспериментальные наблюдения у животных с СД отмечены в литературе [17, 18]. При гипергликемии активируется протеинкиназа C, окислительный стресс и метаболизм гексозаминов, что приводит к понижению экспрессии/активности eNOS [19].



**Рис. 4.** Дилататорная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие ACh на фоне действия селективного блокатора индуцибельной NO-синтазы амингуанидина: — степень расширения сосудов (% от исходного диаметра). Светлая заливка — артерии диаметром 60–80 мкм, темная заливка — артерии диаметром 40–60 мкм, темная штриховка на светлом фоне — артерии диаметром 20–40 мкм, светлая штриховка на темном фоне — артерии диаметром менее 20 мкм.

По оси абсцисс — группы сосудов разного диаметра: группа 1 — контрольные животные; группа 2 — животные ВЖД; группа 3 — животные с СД2.

По оси ординат — степень расширения артерий на воздействие ACh и ACh на фоне L-NAME (%). Значимых изменений для артерий одинакового диаметра из одной и той же группы животных не выявлено.

Показано, что инсулинорезистентность понижала уровень eNOS на эндотелиальных клетках на 60% по сравнению с контролем [20]. Также уменьшение количества eNOS происходит из-за увеличения продукции активных форм кислорода [21]. Следовательно, при СД2 уровень eNOS понижен и реакция ингибирования этого фермента с помощью L-NAME мало выражена. Можно предположить, что при наличии ярко выраженной эндотелиальной дисфункции у крыс с СД2, особенно в мелких артериях, каскад L-аргинина/eNOS/NO в эндотелиальных клетках принимает незначительное участие в формировании дилататорного ответа на ACh.

При СД2 отмечено повышение экспрессии iNOS в головном мозге (в макрофагах, ГМК, нейронах, глии) [7]. Отсутствие ингибирования iNOS неселективным блокатором L-NAME отмечено и в литературе [18, 22] именно при СД или при аллергических реакциях [23]. Авторы предполагают, что при развитии тканевого воспаления с выделением большого количества iNOS обычных концентраций раствора L-NAME (100 мкМ), который применяется для работы с контрольными животными, не хватает для того, чтобы заблокировать всю iNOS. Вероятно, из-за совокупности этих факторов в представленной работе и не было выявлено реакции L-NAME на эндотелий-зависимую дилатацию церебральных артерий у животных с СД2.

Роль iNOS в формировании сосудистого тонуса мозговых артерий у крыс ВЖД и СД2 изучена недостаточно. В немногочисленных работах показано, что iNOS может влиять на тонус и проницаемость церебральных сосудов [24, 25]. Ингибирование активности iNOS селективным блокатором амингуанидином у крыс из контрольной группы вызвало минимальную констрикторную реакцию (рис. 3). Следовательно, реакции с iNOS у контрольных животных не принимают участие в формировании и поддержании сосудистого тонуса в головном мозге. Отсутствие влияния амингуанидина на степени расширения артерий при воздействии ACh (рис. 4) демонстрировало только то, что селективный блокатор iNOS не вызывает отрицательной реакции по ингибированию eNOS у контрольных животных. У крыс из Группы 2 (ВЖД) также не выявлено значимого констрикторного ответа

на воздействие амингуанидина (рис. 3) и уменьшение степени ACh-опосредованной дилатации (рис. 4). Потенциально селективные ингибиторы iNOS могут быть использованы в качестве терапевтического средства, предотвращающего чрезмерную выработку NO при метаболическом синдроме и СД [18, 22].

У крыс с СД2 на воздействие амингуанидина сужением ответило 60–70% всех исследованных пиальных артерий (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что именно реакции с участием iNOS контролируют сосудистый тонус церебральных артерий у животных с СД2 и не затрагивают сигнальный путь L-аргинина/eNOS/NO в эндотелиальных клетках (рис. 4), что также указывает на возможность использования селективных блокаторов iNOS в терапевтических целях при СД2.

Итак, потребление в течение 3 месяцев корма с высоким содержанием жира привело к развитию эндотелиальной дисфункции в пиальных артериях сенсомоторной коры головного мозга. ACh-опосредованная дилатация определялась реакциями с участием eNOS в артериях диаметром менее 40 мкм. У крыс, находящихся только на высокожировой диете, в церебральных артериях не выявили наличия iNOS.

Повышение уровня глюкозы в крови животных с СД2 приводило к прогрессированию эндотелиальной дисфункции: число расширившихся на воздействие ACh сосудов было меньше в 1.2–1.9 раза, чем у животных на ВЖД. При этом сигнальный каскад с участием eNOS не контролировал реактивность артерий. Поддержание сосудистого тонуса в основном происходило за счет реакций с участием iNOS. Основные нарушения в дилататорной реакции у крыс с СД2 – наименьшее число расширившихся на воздействие чистого ACh сосудов со значительным уменьшением степени дилатации (в 1.5–1.6 раза относительно контроля), отсутствие блокировки ACh-опосредованной дилатации на фоне L-NAME, наибольшее число констрикций при воздействии амингуанидина (60–70% от всех исследованных сосудов) – были выявлены в пиальных артериях диаметром менее 40 мкм, т.е. именно в том звене сосудистой сети, которое принимает максимальное участие в газообмене между кровью и тканью.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

И.Б.С. – идея работы и планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U* (2007) Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(11): 2276–2283.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.147835>
2. *Yang Q, Vijayakumar A, Kahn B* (2018) Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(10): 654–672.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0044-8>
3. *Begum N* (2003) Insulin signaling in the vasculature. *Front Biosci* 8: s796–804.  
<https://doi.org/10.2741/1146>

4. *Weber S, Patel R, Lutsep H* (2018) Cerebral amyloid angiopathy: diagnosis and potential therapies. *Expert Rev Neurother* 18(6): 503–513.  
<https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1480938>
5. *Madonna R, Balistreri C, Geng Y, Caterina R* (2017) Diabetic microangiopathy: pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. *Vascular Pharmacol* 90: 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.01.004>
6. *Shi Y, Vanhoutte P* (2017) Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes* 9: 434–449.  
<https://doi.org/10.1111/1753-0407.12521>
7. *Elhessy H, Eltahry H, Erfan O, Mahdi M, Hazem N, El-Shahat M* (2020) Evaluation of the modulation of nitric oxide synthase expression in cerebellum of diabetic albino rats and the possible protective effect of ferulic acid. *Acta Histochem* 122(8): 151633.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151633>
8. *Кайдаш ОА, Иванов ВВ, Венгеровский АИ, Буйко ЕЕ, Щепеткин ИА* (2020) Экспериментальная модель сахарного диабета 2-го типа у крыс, вызванная диетой с высоким содержанием жиров и стрептозотоцином в низкой дозе. *Бюл сибирск мед* 19(2): 41–47. [*Kaydash OA, Ivanov VV, Vengerovsky AI, Buyko EE, Schepetkin IA* (2020) The experimental model of type 2 diabetes mellitus caused by a high-fat diet with low-dose streptozotocin in rats. *Bull Siber Med* 19(2): 41–47. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-2-41-47>
9. *Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul C, Ramarao P* (2005) Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 52: 313–320.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.05.004>
10. *Якимов ИЮ, Бородин ДА, Подрезов ИК, Иванов ВВ, Васильев ВН, Котловский МЮ, Борисов ЛВ, Милто ИВ* (2015) Морфометрические параметры белой жировой ткани разной локализации у крыс при высокожировой диете. *Совр пробл науки и образов* 5. [*Yakimovich IY, Borodin DA, Podrezov IK, Ivanov VV, Vasilyev VN, Kotlovsky MY, Borisova LV, Milto IV* (2015) White adipose tissue morphometric characteristics in hi-fat diet rats. *Modern Probl Sci Educat* 5. (In Russ)].
11. *Шуваева ВН, Горшкова ОП* (2021) Возрастные изменения вклада NO и калиевых каналов в дилатацию пиальных артериальных сосудов у крыс. *Рос физиол журн им И М Сеченова* 107(11): 1440–1452. [*Shuvaeva VN, Gorshkova OP* (2021) Age Changes in the Contribution of NO and Potassium Channels to the Dilatation of the Pial Arterial Vessels in Rats. *Russ J Physiol* 107(11): 1440–1452. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S0869813921110091>
12. *Domingueti C, Dusse L, Carvalho M, Sousa L, Gomes K, Fernandes A* (2016). Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complicat* 30: 738–745.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.12.018>
13. *Haratz S, Tanne D* (2011) Diabetes, hyperglycemia and the management of cerebrovascular disease. *Current Opinion Neurol* 24(1): 81–88.  
<https://doi.org/10.1097/WCO.0bo13e3283418fed>
14. *Ding Y, Vaziri N, Coulson R, Kamanna V, Roh D* (2000) Effects of stimulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(1): E11–E17.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.1.E11>
15. *Arshad N, Lin T, Yahaya M* (2018) Metabolic syndrome and its effect on the brain: possible mechanism. *CNS Neurol Disord Drug Target* 17(8): 595–603.  
<https://doi.org/10.2174/1871527317666180724143258>
16. *Zhou H, Zhang X, Lu J* (2014) Progress on diabetic cerebrovascular diseases. *Bosn J Basic Med Sci* 14(4): 185–190.  
<https://doi.org/10.17305/bjbm.2014.4.203>
17. *Hein T, Omae T, Xu W, Yoshida A, Kuo L* (2020) Role of arginase in selective impairment of endothelium-dependent nitric oxide synthase-mediated dilation of retinal arterioles during early diabetes. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 61(5): 36.  
<https://doi.org/10.1167/iovs.61.5.36>
18. *Kadoi Y, Goto F* (2007) Effect of selective iNOS inhibition on systemic hemodynamics and mortality rate on endotoxemic shock in streptozotocin-induced diabetic rats. *Shock* 28(5): 602–609.  
<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31804d452d>
19. *Toda N, Imamura T, Okamura T* (2010) Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. *Pharmacol Ther* 127(3): 189–209.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.009>
20. *Vicent D, Ilany J, Kondo T, Naruse K, Fisher S, Kisanuki Y, Bursell S, Yanagisawa M, King G, Kahn C* (2003) The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and

- insulin resistance. *J Clin Invest* 111: 1373–1380.  
<https://doi.org/10.1172/JCI15211>
21. *Фатеева ВВ, Воробьева ОВ* (2017) Оксид азота: от механизма действия к фармакологическим эффектам при цереброваскулярных заболеваниях. *Журн неврол психиатрии им СС Корсакова* 117(10): 131–135. [*Fateeva VV, Vorob'eva OV* (2017) Nitric oxide: from the mechanism of action to pharmacological effects in cerebrovascular diseases. *Zhurn Nevrol Psikhiatr im SS Korsakova* 117(10): 131–135. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.17116/jnevro2017117101131-135>
  22. *Strunk V, Hahnenkamp K, Schneuing M, Schneuing M, Fischer L, Rich G* (2001) Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. *Anesth Anal* 92: 681–687.  
<https://doi.org/10.1213/00000539-200103000-00025>
  23. *Antosova M, Strapkova A, Mikolka P, Mokry J, Medvedova I, Mokra D* (2015) The influence of L-NAME on iNOS expression and markers of oxidative stress in allergen-induced airway hyperreactivity. *Advx Exp Med Biol—Neurosci Respirat* 7: 1–10.  
[https://doi.org/10.1007/5584\\_2014\\_62](https://doi.org/10.1007/5584_2014_62)
  24. *Nassi A, Malorgio F, Tedesco S, Cignarella A, Gaion R* (2016) Upregulation of inducible NO synthase by exogenous adenosine in vascular smooth muscle cells activated by inflammatory stimuli in experimental diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 15: 32.  
<https://doi.org/10.1186/s12933-016-0349-x>
  25. *Barrett E, Liu Z, Khamaisi M, King G, Klein R, Klein B, Hughes T, Craft S, Freedman B, Bowden D, Vinik A, Casellini C* (2017) Diabetic microvascular disease: an endocrine society scientific statement. *J Clin Endocrinol Metab* 102(12): 4343–4410.

## Participation of iNOS in the Formation of Pial Arteries Tone in Metabolic Disorders and Streptozotocin Diabetes in Rats Kept on a High-Fat Diet

I. B. Sokolova\*

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

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

Changes in acetylcholine (ACh)-mediated dilatation of the pial arteries of the sensorimotor cortex of the brain in Sprague Dawley rats after the developing of metabolic and hormonal disorders similar to type 2 diabetes mellitus were studied. The rats were kept on a high-fat diet for 2 months, and then some of the animals were injected with a low dose of streptozotocin (35 mg/kg). Then, all animals were fed with a high-fat food, for another 1 month. The effects of pure ACh ( $10^{-7}$  M), or ACh against the background of the action of the non-selective blocker of NO synthase L-NAME, or ACh against the background of the action of the selective blocker of inducible NO synthase (iNOS) aminoguanidine (AG) were evaluated using the method of intravital microphotography. We found that the consumption of high-fat food for 3 months in (HFD group) led to the development of endothelial dysfunction (ED) in the pial arteries of the sensorimotor cortex of the brain; the number of vessels expanded to the effect of ACh in HFD group was 1.2–1.6 times less than in the control group. ACh-dependent dilatation depends on eNOS only in arteries with a diameter of less than 40  $\mu$ m. The presence of iNOS was not detected in the cerebral arteries in rats kept on HFD. Animals from T2D modeling group also developed ED in the cerebral arteries; the number of vessels expanded to the effect of ACh was 1.6–2.3 less than in the control group. In T2D group, the signaling cascade involving eNOS did not control arterial reactivity. Vascular tone maintenance was mainly due to reactions involving iNOS. The main disorders of the dilator reaction in rats with T2D, i.e. the smallest number of blood vessels dilated in response to pure ACh with a significant decrease in the degree of dilatation (by 1.5–1.6 times relative to control), the absence of blocking of ACh-mediated dilatation against the background of L-NAME, the greatest the number of constrictions in response to AG (60–70% of all examined vessels), were detected in pial arteries with a diameter of less than 40  $\mu$ m, i.e., in that part of the vascular network that takes the maximum part in gas exchange between blood and tissue.

**Keywords:** high-fat diet, type 2 diabetes mellitus, pial vessels, endothelial dysfunction, endothelial and inducible NO-synthases, acetylcholine, dilatation

**ДИСБАЛАНС ГОРМОНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В РЕГУЛЯЦИЮ  
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО БАЛАНСА У БОЛЬНЫХ ОЖИРЕНИЕМ – ИЗУЧЕНИЕ  
ВКЛАДА В НАРУШЕНИЕ ПИЩЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ  
И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ**

© 2022 г. А. Ю. Бабенко<sup>1</sup>, \*, Г. А. Матвеев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: [alina\\_babenko@mail.ru](mailto:alina_babenko@mail.ru)

Поступила в редакцию 14.07.2022 г.

После доработки 15.08.2022 г.

Принята к публикации 22.08.2022 г.

У здоровых людей в постпищевом статусе происходит закономерная динамика уровня гормонов, вовлеченных в регуляцию пищевого поведения и энергетического баланса. Данные у пациентов с ожирением носят гетерогенный характер. Целью нашего исследования было изучение характера динамики изменений уровня ряда гормонов (лептина, грелина, глюкагоноподобного пептида 1 (ГПП-1), глюкозозависимого инсулиноподобного пептида (ГИП)) и установление их взаимосвязи с факторами, характеризующими метаболический статус и пищевое поведение. В исследование были включены 66 пациентов (12 мужчин и 54 женщины) с ожирением, средний возраст  $37.8 \pm 10.8$  лет, средняя масса тела (МТ)  $105.2 \pm 16.7$  кг, индекс МТ  $37.3 \pm 4.8$  кг/м<sup>2</sup>. У всех пациентов было проведено антропометрическое обследование, измерение уровня артериального давления, исследованы показатели углеводного и липидного обмена. Уровень изучаемых гормонов (лептин, ГИП, ГПП-1, грелин) определяли натощак и через 60 мин после стандартного завтрака, содержащего 60 г углеводов. Было отмечено, что у разных пациентов с ожирением имеются разнонаправленные изменения уровня изученных гормонов. У части пациентов сохраняется динамика типичная для здоровых людей, у большинства – либо ослабление постпищевых пиков (у 48.2% обследованных ослабление пика ГПП-1, у 50% – ослабление пика ГИП), либо аномальная динамика (отсутствие снижения уровня грелина у 60.8%, отсутствие повышение лептина у 83.3%). Патологическая динамика уровня гормонов в постпищевом статусе была ассоциирована с более выраженными изменениями параметров, отражающих метаболически нездоровый тип (повышенные уровни глюкозы и триглицеридов, повышенный индекс НОМА-IR) и нарушения пищевого поведения. Полученные данные демонстрируют наличие различных подтипов ожирения по постпищевой динамике уровня гормонов, вовлеченных в регуляцию аппетита и энергетический баланс. Те подтипы, которые, вероятно, отражают развивающуюся при ожирении резистентность к этим гормонам и/или их дефицит, характеризуются худшими характеристиками метаболического здоровья.

*Ключевые слова:* лептинорезистентность, грелинорезистентность, глюкагоноподобный пептид 1, глюкозозависимый инсулиноподобный пептид, ожирение, пищевое поведение

DOI: 10.31857/S0869813922090047

Ожирение – пандемия 21 века, среди ключевых характеристик которой – нарушение регуляции аппетита и пищевого поведения. Пищевое поведение находится под контролем сложной системы, которая включает центральные и гуморальные звенья регуляции [1]. В обеспечении центральных механизмов ключевую роль играет кора и зоны вознаграждения в лимбической системе (“гедонистическая” регуляция) [2], а также гипоталамус, стимуляция вентромедиальных ядер которого сопровождается снижением аппетита, а стимуляция латеральных ядер – его усилением. Ведущую роль в обеспечении гуморальной (гомеостатической, периферической) регуляции играют гормоны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и жировой ткани. Известно более 20 гормонов, в различной степени вовлеченных в регуляцию пищевого поведения и обладающих орексигенными или анорексигенными эффектами. Среди гормонов, обладающих орексигенным действием, ведущую роль играет грелин, а наиболее значимыми анорексигенными гормонами являются гормон ЖКТ глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1) и гормон жировой ткани лептин [3]. Инсулин также является аппетит-регулирующим гормоном, проявляя свою активность в гипоталамусе в вентральной тегментальной зоне, где уменьшает опосредуемое через дофаминергические нейроны потребление пищи и удовольствие от еды. Не вызывает сомнений важная роль нарушения эффектов этих гормонов в дисрегуляции системы пищевого поведения и развитии гиперфагии, характерной для пациентов с ожирением и в значительной степени препятствующей снижению веса [4].

В условиях нормальной физиологии лептин подавляет активность нейронов в вентральной тегментальной зоне, снижая мотивацию к приему вкусной пищи, снижает вкусовое, зрительное и обонятельное восприятие пищи. Таким образом, лептин вовлечен не только в периферический, но и в гедонистический контроль пищевого поведения, способен подавлять активность системы еда/награда. Прогрессия ожирения (увеличение объема жировой ткани) и его переход в метаболически нездоровый фенотип (перераспределение депонирования жира из подкожного депо в висцеральное) ассоциированы с увеличением дисбаланса адипокинов – гормонов жировой ткани. При этом, несмотря на повышение уровня лептина, его эффекты снижены, что указывает на нарушение чувствительности к этому гормону. По данным одних исследований, его уровень у людей с нормальной массой тела либо не изменяется [5], либо постепенно повышается в течение 180 мин после пищевой нагрузки, причем в большей степени после углеводной [6]. По данным других авторов, уровень лептина снижается через 2 ч после приема жирной пищи, но не изменяется после перорального глюкозотолерантного теста (ОГТ) [7]. При ожирении происходит снижение уровня лептина через 30–60 мин после ОГТ, но его уровень не изменяется после приема пищи богатой жирами [7]. Эти результаты в целом совпадают с результатами Adamska-Patrino и соавт. [6], согласно которым при ожирении уже через 30 мин происходит значимое снижение уровня лептина, которое сохраняется на этом уровне длительно после углеводной нагрузки и возвращается к исходному уровню через 60 мин после эугликемической пищевой нагрузки.

Грелин, гормон, большая часть которого секретируется в фундальных отделах желудка [8], напротив, повышает активность нейронов в вентральной тегментальной зоне, стимулируя мотивацию к приему вкусной пищи, алкоголя и наркотиков, повышает активность опиоидной и эндоканнабиноидной систем (усиливает удовольствие от приема пищи и других вышеперечисленных стимулов), индуцирует нерациональное импульсивное поведение. У пациентов с ожирением его концентрация ниже и составляет около 68% от уровня, типичного для людей с нормальным весом [9], что, вероятно, обусловлено адаптивной реакцией в ответ на положительный энергетический баланс. Степень снижения уровня грелина натощак обратно пропорциональна ИМТ [10]. У людей с нормальной массой тела происхо-

дит снижение уровня грелина после приема пищи, что указывает на ингибирование его продукции в состоянии избытка энергии (повышение уровня глюкозы и других нутриентов) [11], а величина подавления связана с количеством полученной энергии (нутриентов) [12] и характером пищи [6]. В стандартизированных условиях (стандартный углеводный завтрак) у здоровых людей его уровень снижается через 30 мин после еды примерно на 30–50% и остается на этом уровне как минимум до 120 мин теста, а у пациентов с ожирением его содержание не меняется [10].

Из гормонов ЖКТ наибольший интерес исследователей вызывают инкретины – интестинальные гормоны, роль которых в регуляции энергетического баланса не вполне определена. Роль ГПП-1 – гормона, секретируемого L-клетками кишечника в ответ на прием пищи, более очевидна. Его основными функциями являются стимуляция секреции инсулина, увеличение пролиферации и выживаемости  $\beta$ -клеток, ингибирование высвобождения глюкоагона  $\alpha$ -клетками и подавление аппетита. Так как три четверти ГПП-1, секретируемого в кишечнике, разрушается дипептидилпептидазой 4-го типа в течение 1–2 мин, еще около 50% деградирует в печени и в циркуляцию попадает лишь 10–12% ГПП-1 [13], эндокринный механизм не является основным в реализации эффектов этого гормона на головной мозг. В большей степени эффекты ГПП-1, секретируемого в кишечнике, на потребление пищи могут быть обусловлены его влиянием на мозг через ГПП-1-чувствительные нейроны блуждающего нерва [14]. Кроме того, ГПП-1 секретируется в головном мозге и может непосредственно влиять на специфические центры, регулирующие аппетит в гипоталамусе [13]. ГПП-1 ингибирует аппетит не только непосредственно, но и путем регуляции продукции грелина [15, 16] и количества растворимых рецепторов лептина (LepRs) [17]. Показано, что у пациентов с ожирением увеличение количества LepRs является одним из механизмов развития лептин-резистентности. Агонисты ГПП-1 (аГПП-1) ингибируют увеличение числа LepRs, сохраняя уровень свободного лептина и предотвращая набор массы тела [18]. В норме уровень ГПП-1 низкий натошак и повышается в постпищевом статусе [19]. В ряде исследований показано, что при ожирении секреция ГПП-1 снижается, что опосредует снижение чувства сытости [20]. В других исследованиях было показано, что уровни ГПП-1 положительно связаны с ИМТ, уровнями инсулина и лептина и отрицательно связаны с содержанием адипонектина. Отмечается, что более высокий уровень ГПП-1 при ожирении ассоциирован с развитием метаболических нарушений. На основании этих данных, японские исследователи [21] предложили гипотезу, согласно которой высокий уровень ГПП-1 у больных с ожирением является следствием центральной резистентности к нему, по аналогии с выше описанной резистентностью к лептину и грелину. Таким образом, нарушение чувствительности к ГПП-1 может лежать в основе нарушения регуляции аппетита и инсулинорезистентности (ИР). Учитывая, что ГПП-1 вовлечен в обеспечение гедонистического контроля не только в отношении пищевого (сигналы насыщения), но и кокаин-амфетамин регулирующего транскрипта (снижает удовольствие от потребления алкоголя и наркотиков), у пациентов с ожирением может увеличиваться приверженность к этим зависимостям.

Глюкозозависимый инсулиноотропный пептид (ГИП) оказывает аналогичные ГПП-1 эффекты на функцию  $\beta$ -клеток, но в большей степени вовлечен в регуляцию жирового метаболизма, чем углеводного. В эксперименте показано, что жирная еда приводит к гиперплазии K-клеток и увеличению секреции ГИП, который, в свою очередь, усиливает адипогенез [22]. ГИП действует на адипоциты непосредственно через его рецепторы (GIPR), регулируя метаболизм липидов. В зависимости от уровня инсулина ГИП может усиливать либо липолиз, либо адипогенез. Эффекты ГИП на жировую ткань частично отрегулированы через активацию липопротеиновой липазы (LPL). Секреция ГИП в ЖКТ увеличивает уровень инсу-

лина, и в условиях высокого уровня инсулина и нормальной к нему чувствительности ГИП ингибирует липолиз в адипоцитах и стимулирует адипогенез через рецептор инсулина. Таким образом, в условиях нормальной чувствительности к инсулину, ГИП способствует здоровому балансу липидов, стимулируя их депонирование в подкожной жировой ткани. Между тем, экспрессия гена *GIPRs* в подкожной жировой ткани отрицательно коррелирует с ИМТ, объемом талии и уровнем триглицеридов [23]. В норме уровень ГИП низкий натощак и повышается после углеводной нагрузки в 2–3 раза, достигая пика к 60-й минуте [24]. При ожирении были отмечены разнонаправленные изменения его уровня: в одних исследованиях не было значимых отличий в его динамике у людей с нормальной массой тела [24], в других отмечено значимое снижение постпищевое пика при ожирении [25]. В работе Шестаковой и соавт., наоборот, было отмечено нарастание постпищевое пика ГИП вместе с увеличением ИМТ [19]. Это может быть связано с разными типами пищевой нагрузки и разными характеристиками пациентов. Высокожировое питание может непосредственно влиять на продукцию ГИП, увеличивая ее, но при этом может снижать чувствительность к нему, формируя, как минимум, парциальную резистентность. Имеются единичные данные, указывающие на связь тощакового уровня ГИП с параметрами, отражающими метаболическое здоровье. Так, в исследовании Шестаковой с соавт. отмечен значимо более высокий уровень ГИП у пациентов с ИР [19], в исследовании Goralska [26] была установлена взаимосвязь между высоким уровнем ГИП при ожирении и неалкогольной жировой болезнью печени. В исследовании Yamaoka-Tojo [27] наблюдалось значительное взаимодействие между циркулирующим ГПП-1 и ГИП натощак, сывороточным холестерином липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), триглицеридами и мочевой кислотой в сыворотке крови. В то же время исследований, изучивших особенности постпищевой динамики уровня этих гормонов и ее взаимосвязь с метаболическими параметрами, в литературе практически не представлено. Таким образом, все большее количество данных указывает на то, что для ожирения характерно развитие резистентности к многим гормонам, вовлеченным в регуляцию энергетического баланса. Не вызывает сомнений развитие резистентности к лептину и грелину. Между тем, является ли развитие этих изменений неизменным атрибутом любого фенотипа ожирения, или их выраженность может варьировать в зависимости от фенотипа ожирения (гиноидное, андроидное, висцеральное, подкожное, метаболически здоровое/нездоровое) и, возможно, определять особенности нарушений пищевого поведения у отдельных пациентов, не установлено. В настоящее время вклад резистентности к гормонам в нарушения пищевого поведения при ожирении мало изучен. Также мало данных имеется о чувствительности к инкретинам при ожирении и факторах, которые влияют на ее состояние.

Как отмечено выше, одним из методов оценки чувствительности к гормонам, вовлеченным в регуляцию нутритивного баланса, является их оценка в постпищевом статусе. Уровни инкретинов, основным стимулом секреции которых является прием пищи, значимо и наиболее рано повышаются в постпищевом статусе. Пик их секреции приходится на точку 30 мин после приема углеводов, хотя для ГИП – инкретина, в большей степени вовлеченного в регуляцию жирового обмена, прием жирной пищи может вызвать больший и более поздний пик секреции ГИП. Пиковый уровень инкретинов сохраняется и в точке 60 мин. Уровень грелина – орексигенного гормона, также продуцируемого в основном в ЖКТ (фундальные отделы желудка), натощак высок и снижается на 35–50% через 60–120 мин после приема углеводов. В отношении постпищевой динамики уровня лептина, как отмечено выше, в настоящее время единого мнения нет. В норме лептин – анорексигенный гормон, а значит, его уровень должен повышаться в постпищевом статусе. Но если при ожирении имеется выраженная резистентность к лептину, то его уровень резко

повышен натошак и может существенно не изменяться в постпищевом статусе. Как уже отмечено, у разных гормонов имеются разные сроки реагирования, но для инкретин, грелина и инсулина есть точка, в которой их уровни будут пиковыми — это точка 60 мин после приема углеводов. Хотя в отличие от гормонов ЖКТ, стимулированная секреция лептина может происходить в значительно более поздний период времени, ряд исследований свидетельствует о ее повышении через 60 мин после углеводной нагрузки. Это явилось причиной выбора данной точки для оценки постпищевой динамики изучаемых гормонов. Не исключено, что выраженность резистентности к лептину может существенно варьировать в группах с различным статусом метаболического здоровья, и это явилось причиной дисбаланса в результатах различных исследований.

В связи с этим целью нашего исследования стало изучение динамики ряда гормонов, регулирующих пищевое поведение, натошак и через 1 ч после стандартного углеводного завтрака, сравнение изменений данных гормональных показателей с группой здорового контроля и оценка его связи с факторами, отражающими метаболическое здоровье и пищевое поведение.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом НМИЦ им. В.А. Алмазова (выписка из протокола № 022018-14д от 12 февраля 2018 г.).

В настоящее исследование включались пациенты с ожирением, соответствующие следующим критериям. Критерии включения: мужчины и женщины старше 18 лет с ИМТ  $\geq 30$  кг/м<sup>2</sup>; документально оформленное согласие пациента на участие в исследовании. Критерии невключения: существенная патология сердечно-сосудистой системы (артериальная гипертензия с нецелевыми уровнями артериального давления, наличие в анамнезе инфаркта миокарда, острого нарушения мозгового кровообращения, стенокардии, хронической сердечной недостаточности выше 2-го функционального класса по NYHA, аритмий высокого риска); наличие сахарного диабета; наличие заболеваний, сопровождающихся изменением функции щитовидной железы; хроническая патология почек со сниженной скоростью клубочковой фильтрации.

В соответствии с данными критериями в исследование были включены 66 пациентов (12 мужчин (18.2%) и 54 женщины (81.8%)) с ожирением, средний возраст  $37.8 \pm 10.8$  лет, средняя масса тела (сМТ)  $105.2 \pm 16.7$  кг, ИМТ  $37.3 \pm 4.8$  кг/м<sup>2</sup>. Исходная характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Методы обследования: при включении в исследование всем пациентам выполнялся физикальный осмотр: измерение роста в см, веса в кг, расчет ИМТ в кг/м<sup>2</sup>, измерение окружности талии (ОТ) и окружности бедер (ОБ) в см, измерения уровня артериального давления в мм рт.ст.

Оценку биохимических параметров проводили с использованием автоматического анализатора (Cobas c311, Roche, автоматизированный биохимический анализатор, Швейцария) и коммерческих наборов (наборы реагентов Roshe, Швейцария). Референсные значения для различных биохимических параметров: глюкоза в плазме натошак 3.30–6.10 ммоль/л с диапазоном измерения 0.11–41.1 ммоль/л; общий холестерин (ОХС) с диапазоном измерения 0.1–20.7 ммоль/л и нормальным значением 3.50–5.00 ммоль/л; триглицериды сыворотки с диапазоном измерения 0.1–

Таблица 1. Исходная характеристика пациентов с ожирением

Исследуемые параметры	Пациенты с ожирением <i>n</i> = 66	Референсные или целевые интервалы, где применимо	
Возраст, лет	37.8 ± 10.8	NA	
Масса тела, кг	105.2 ± 16.7	NA	
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	37.3 ± 4.8	<25	
ОТ, см	М и Ж	108.2 ± 11.6	
	Мужчины	116.4 ± 8.2	<90
	Женщины	106.3 ± 11.5	<84
ОБ, см	М и Ж	119.6 ± 9.5	
	Мужчины	114.7 ± 6.05	NA
	Женщины	120.7 ± 9.9	NA
Глюкоза натощак, ммоль/л	5.3 ± 0.6	3.3–6.1	
Инсулин натощак, пмоль/л	162.2 ± 95.7	17.8–173.0	
НОМА-IR	6.0 ± 5.0	<2.77	
НОМА-В	285.2 ± 214.6	>100	
ОХС, ммоль/л	5.05 ± 1.03	<4.5	
ХС ЛПВП, ммоль/л	М и Ж	1.32 ± 0.35	
	Мужчины	1.1 ± 0.28	>1.0
	Женщины	1.37 ± 0.35	>1.2
ХС ЛПНП, ммоль/л	3.02 ± 0.81	<1.8	
ТГ, ммоль/л	1.52 ± 0.74	<1.7	
САД, мм рт. ст.	119.4 ± 13.4	<140	
ДАД, мм рт. ст.	71.8 ± 9.1	<85	

ИМТ – индекс массы тела; ОТ – окружность талии; ОБ – окружность бедер; НОМА-IR – индекс резистентности к инсулину; НОМА-В – индекс секреции инсулина; ОХС – общий холестерин; ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности; ТГ – триглицериды; САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление.

10.0 ммоль/л и нормальным значением <1.77 ммоль/л; ЛПВП с диапазоном измерения 0.08–3.12 ммоль/л и нормальным значением для женщин >1.2 ммоль/л, для мужчин >1.0 ммоль/л. Уровень инсулина в сыворотке крови измеряли с использованием автоматического анализатора (Cobas e411, Roche, полностью автоматизированный иммунохимический электрохемилюминесцентный анализатор, Швейцария) и с использованием коммерческих наборов Insulin Elecsys, Cobas e (Roche, Швейцария), с диапазоном измерения 1.39–6945 МкМЕ/мл и нормальным значением 17.8–173.0 пмоль/л. Коэффициент пересчета пмоль/л × 0.144 = мкЕ/мл.

Уровень грелина, ГПП-1 и ГИП в плазме крови, а лептина – в сыворотке крови измеряли с помощью иммуноферментного анализа с использованием автоматического анализатора (BioRad 680-монитор, автоматизированный анализатор, США). Для грелина (коммерческий набор BCM Diagnostics, США) диапазон измерения 0.0–1000 пг/мл, для ГПП-1 (коммерческий набор BCM Diagnostics, США) диапазон измерения 0.0–25.0 пг/мл, чувствительность 0.04 пг/мл, для ГИП (коммерческий набор ELISA Kit for Gastric Inhibitory Polypeptide (Cloud-Clone Corp., США) диапазон измерения 61.7–5000 пг/мл, коэффициент чувствительности <23.9 пг/мл, для

лептина (коммерческий набор для проведения иммуноферментного анализа (DVC, США) диапазон измерения от 2.0 до 11.0 нг/мл, чувствительность 0.5 нг/мл.

В связи с отсутствием общепринятой нормы для ГПП-1, ГИП и грелина, в исследование была включена группа здоровых людей, состоящая из 19 человек (сотрудников НМИЦ им. В.А. Алмазова, подписавших информированное согласие и не имевших каких-либо хронических заболеваний, включая дислипидемию, нарушение углеводного обмена, артериальную гипертензию и ожирение по результатам диспансеризации. Эта группа включала 5 мужчин (26.3%) и 14 женщин (73.7%) и была сопоставима по возрасту и соотношению полов с группой пациентов с ожирением. Средний уровень глюкозы крови у данной выборки составил  $4.9 \pm 0.7$  ммоль/л, ОХС  $4.4 \pm 0.5$  ммоль/л, ХС-ЛПВП  $1.4 \pm 0.2$  ммоль/л, ХС-ЛПНП  $1.7 \pm 0.4$  ммоль/л, ТГ  $1.4 \pm 0.3$  ммоль/л, систолическое артериальное давление  $117.4 \pm 9.9$  мм рт. ст., диастолическое артериальное давление  $79 \pm 6.6$  мм рт. ст. В этой группе были оценены уровни ГПП-1, ГИП и грелина.

У обследованных пациентов с ожирением выявлен более высокий уровень ГПП-1 ( $3.8 \pm 1.1$  vs  $2.0 \pm 1.4$  нг/мл,  $p \leq 0.001$ ), существенно меньший уровень ГИП ( $219.8 \pm 148.7$  vs  $607.9 \pm 215.5$  нг/мл,  $p \leq 0.001$ ) и грелина ( $3.4 \pm 2.4$  vs  $4.7 \pm 6.0$  нг/мл,  $p \leq 0.05$ ) по сравнению с группой здорового контроля (ГЗК).

Уровень ГПП-1, ГИП и грелина был оценен у 56 пациентов, а лептина – у всех 66 человек с ожирением, натощак и через 60 мин после стандартного завтрака. Стандартный углеводный завтрак включал: 2 куска хлеба (50 г черного хлеба), 1 небольшой фрукт (яблоко 200 г или апельсин 200 г) и стакан сладкого сока (250 мл). Всеми пациентами были заполнены опросники в соответствии с дизайном исследования: голландский опросник пищевого поведения (Dutch Eating Behavior Questionnaire (DEBQ)), визуально-аналоговая шкала, состоящая из 4 вопросов (Насколько голодным вы себя чувствуете? Насколько сытым вы себя чувствуете? Насколько сильно вы хотите есть? Сколько пищи вы могли бы сейчас съесть?).

При анализе DEBQ в большинстве случаев были выявлены смешанные нарушения пищевого поведения, среди которых преобладали нарушения эмоциогенного и ограничительного характера. Пациентов без нарушений пищевого поведения в нашем исследовании выявлено не было. Для упрощения анализа у пациентов со смешанными вариантами определялся доминантный тип нарушения пищевого поведения. Для определения доминантного типа был рассчитан процент отклонений от нормальных значений для каждого типа пищевого поведения, и тот тип пищевого поведения, по которому определялся наибольший процент отклонений, фиксировался как доминантный.

Статистический анализ. Статистический анализ был проведен с использованием STATISTICA 10 (StatSoft Inc, США) для Windows. Данные были представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение или число (%). Распределение всех изучаемых переменных имело отклонение от нормального ( $p < 0.05$  в тесте Колмогорова–Смирнова), поэтому для сравнения выборок использовались непараметрические тесты. Для сравнения двух независимых выборок с интервальной шкалой использовался критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости ( $p$ ) для проверки статистических гипотез при сравнении статистических показателей принимался менее 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При рассмотрении исследуемой группы, состоящей из 66 пациентов с ожирением, установлено, что медиана ИМТ соответствовала 2-ой степени ожирения, медиана возраста соответствовала молодому возрасту. Медианы уровней липидов (за исключением ЛПНП –  $3.0 \pm 0.8$  ммоль/л), артериального давления, глюкозы были

в пределах адекватного контроля, но индекс НОМА-IR ( $6.0 \pm 5.0$ ) указывал на наличие ИР. Детальная характеристика данной группы представлена в табл. 1.

При анализе характеристик пищевого поведения было установлено, что средний % пациентов с доминантным эмоциогенным типом нарушения пищевого поведения (ЭмПП) составил 72.2%, с экстернальным типом (ЭксПП) – 11.1%, с ограничительным типом (ОПП) – 16.7%, то есть с наибольшей частотой встречался ЭмПП.

Уровень лептина был повышен в группе пациентов с ожирением. Имелась прямая корреляционная зависимость между уровнем лептина и ИМТ, отмечались гендерные отличия в его уровне – у женщин было выявлено значимо большее повышение уровня лептина при той же степени ожирения и ИМТ (1-я степень ожирения,  $p \leq 0.001$ ; 2-я степень ожирения,  $p \leq 0.001$ ; 3-я степень ожирения,  $p \leq 0.01$ ). Уровень лептина натощак и через 1 ч после стандартного углеводного завтрака у мужчин составил  $24.9 \pm 19.6$  и  $21.9 \pm 17.2$  нг/мл, а у женщин был значительно выше –  $82.3 \pm 29.5$  и  $76.5 \pm 28.5$  пг/мл соответственно. Снижение уровня лептина через час после углеводной нагрузки было статистически значимым как у мужчин ( $p \leq 0.01$ ), так и у женщин ( $p \leq 0.001$ ). Между тем, у разных пациентов динамика лептина после еды имела разнонаправленный характер. В зависимости от динамики уровня лептина после стандартного углеводного завтрака мы выделили три группы:

Группа 1 – уровень лептина повышается после еды на  $\geq 10\%$  от исходного (11 пациентов, 16.7%).

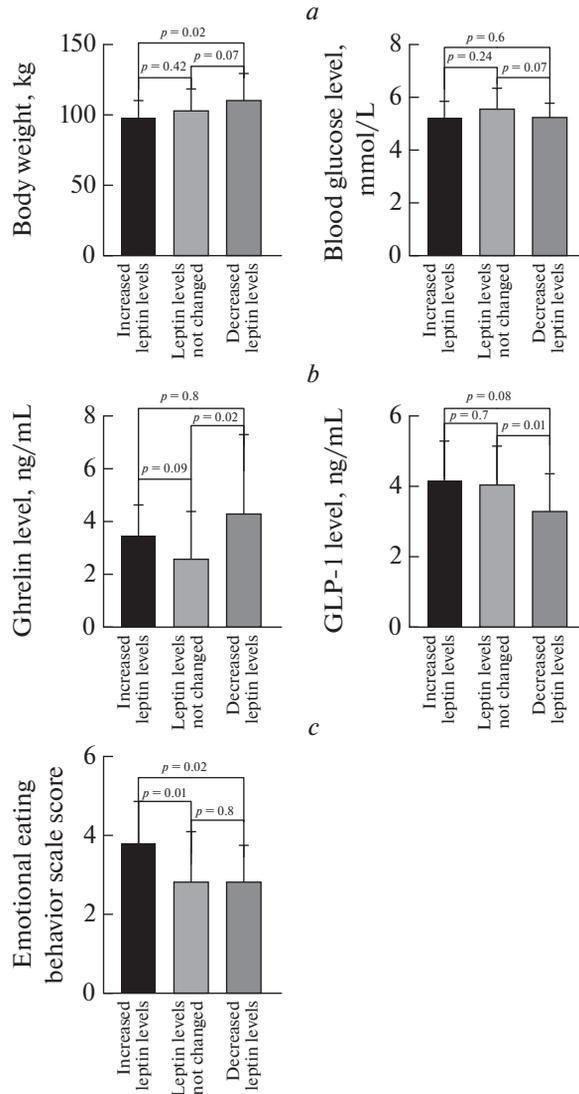
Группа 2 – уровень лептина после еды изменяется не более, чем на 10% от исходного (26 пациентов, 39.4%).

Группа 3 – уровень лептина снижается после еды на  $\geq 10\%$  от исходного (11 пациентов, 43.9%).

Мы сравнили основные метаболические параметры (ИМТ, иНОМА-IR, иНОМА-В, уровень глюкозы, липидов), артериальное давление, содержание других изученных гормонов в этих группах. Также были сравнены характеристики пищевого поведения.

При сравнении антропометрических показателей в группе со снижением уровня лептина после углеводной нагрузки было отмечено, что у этих пациентов масса тела и окружность бедер были больше, чем в других группах ( $p \leq 0.05$  в обоих случаях) (рис. 1а). Других статистически значимых отличий антропометрических показателей, а также показателей углеводного и липидного обменов выявлено не было. В группе пациентов с понижением лептина после стандартного углеводного завтрака выявлен более высокий уровень грелина натощак ( $p \leq 0.05$ ), а уровень ГПП-1 был ниже, чем в других группах ( $p \leq 0.01$ ) (рис. 1б). Различия между группами по данным опросников пищевого поведения наблюдались только по параметру “балл по шкале эмоциогенного пищевого поведения”, который был ниже в группе с понижением уровня лептина после стандартного углеводного завтрака (рис. 1с).

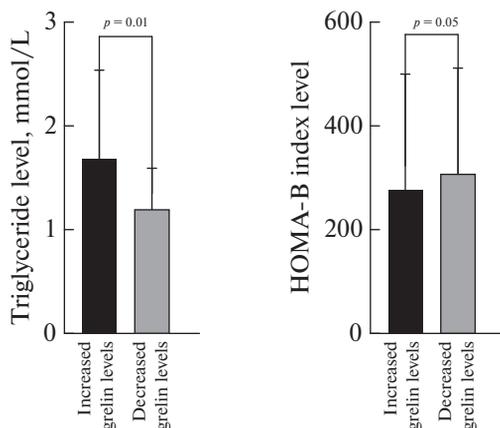
Был оценен уровень грелина натощак и через 1 ч после стандартного завтрака. Уровень грелина натощак был значимо ниже, чем в контрольной группе ( $p \leq 0.05$ ). После стандартного углеводного завтрака достоверного изменения уровня грелина в общей группе выявлено не было. В связи с тем, что уровень грелина после углеводного завтрака не снижался адекватно в общей группе, а изменение его содержания носило разнонаправленный характер, были сформированы 2 группы: первая – пациенты с понижением грелина после пищевой нагрузки и вторая – с аномальным повышением уровня грелина. Повышение уровня грелина после углеводной нагрузки было выявлено у 60.8% пациентов, а снижение на 35% и более у 39.2% пациентов. В группе со снижением грелина после стандартного углеводного завтрака содержание грелина натощак был значимо выше ( $p \leq 0.01$ ). Уровень грелина имел отрицательную взаимосвязь с уровнем ГПП-1 ( $r = -0.33$ ,  $p \leq 0.01$ ), уровень грелина через 60 мин после завтрака имел аналогичную отрицательную взаимосвязь с уровнем ГПП-1 в этой же точке ( $r = -0.3$ ,  $p \leq 0.05$ ) и положительную – с индексом НОМА-IR



**Рис. 1.** Различия массы тела и глюкозы крови (а), уровней грелина и ГПП-1 натощак (b), пищевого поведения (с) у пациентов с разнонаправленной динамикой уровня лептина после стандартного углеводного завтрака.

( $r = 0.4$ ,  $p \leq 0.01$ ). Группы с адекватным снижением содержания грелина после еды и без адекватного снижения были сравнены между собой по метаболическим параметрам. В группе со снижением грелина уровень триглицеридов был ниже ( $p \leq 0.05$ ), а уровень НОМА-В выше ( $p \leq 0.05$ ) (рис. 2). Других достоверных отличий в исследуемых параметрах выявлено не было.

Балл по шкалам различных типов пищевого поведения и визуально-аналоговой шкале значимо не различался в группах с различной постпищевой динамикой уровня грелина.

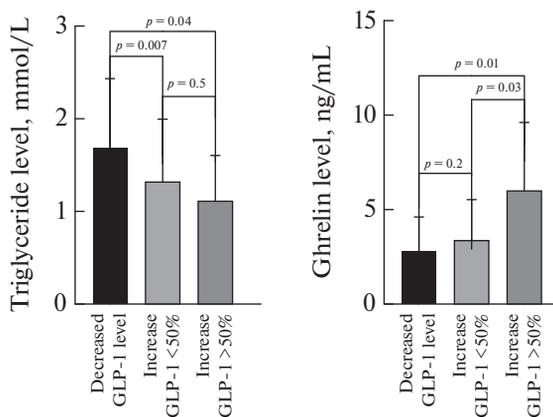


**Рис. 2.** Различия в уровнях триглицеридов и индекса НОМА-В у пациентов с разнонаправленной динамикой уровня грелина после стандартного углеводного завтрака.

Уровень ГПП-1 был повышен при ожирении по сравнению с группой здоровых людей ( $3.7 \pm 1.1$  и  $2.0 \pm 1.4$ ,  $p \leq 0.001$ ). В соответствии с данными литературы, у здоровых людей уровень ГПП-1 после углеводной нагрузки повышается более чем в 2 раза. У обследованных пациентов с ожирением уровень ГПП-1 после завтрака не менялся ( $3.7 \pm 1.1$  vs  $3.8 \pm 1.3$  нг/мл), что можно расценивать как резистентность к ГПП-1. В связи с тем, что изменения постпрандиального уровня ГПП-1 различались у отдельных пациентов, мы разделили пациентов на группы с адекватным (>50%) повышением уровня ГПП-1 после углеводной нагрузки и без него. После углеводной нагрузки у 48.2% ( $n = 27$ ) было выявлено снижение уровня ГПП-1, у 41.1% – повышение уровня ГПП-1 менее чем на 50% ( $n = 23$ ) и лишь у 10.8% ( $n = 6$ ) найдено адекватное повышение содержания ГПП-1 более чем на 50%.

В группе с повышением уровня ГПП-1 более 50% был выявлен более низкий уровень триглицеридов ( $1.1 \pm 0.5$  vs  $1.7 \pm 0.7$  vs  $1.3 \pm 0.6$ ,  $p \leq 0.05$ ) и ГПП-1 натошак ( $2.6 \pm 0.6$  vs  $4.0 \pm 1.2$  vs  $3.7 \pm 0.9$ ,  $p \leq 0.05$ ), более высокий уровень грелина натошак ( $6.0 \pm 3.6$  vs  $2.8 \pm 1.8$  vs  $3.4 \pm 2.1$ ,  $p \leq 0.05$ ) (рис. 3) и диастолического артериального давления ( $78.3 \pm 9.8$  vs  $69.9 \pm 8.0$  vs  $69.3 \pm 8.3$ ,  $p \leq 0.05$ ). Значимых отличий в сумме баллов по шкалам нарушений пищевого поведения и визуально-аналоговой шкале в группах с различной постпищевой динамикой ГПП-1 выявлено не было.

Уровень ГИП натошак у пациентов с ожирением был достоверно ниже, чем у здоровых людей ( $219.8 \pm 148.7$  vs  $607.9 \pm 215.5$ ,  $p \leq 0.001$ ), что указывает на его дефицит. При этом медиана уровня ГИП после углеводного завтрака значимо не менялась ( $219.8 \pm 148.7$  vs  $199.1 \pm 109.5$  пг/мл), однако изменения постпрандиального уровня ГИП имели разнонаправленный характер: у части больных – адекватное (более 50%) повышение, у части – незначительное повышение или снижение. В связи с этим все пациенты были разделены на группы с повышением и понижением уровня ГИП после нагрузки: у 50% ( $n = 28$ ) было выявлено снижение уровня ГИП, у 28.6% найдено повышение менее 50% ( $n = 16$ ) и у 21.4% ( $n = 12$ ) адекватное повышение уровня ГИП более чем на 50%. В группе с повышением уровня ГИП более 50% был выявлен более низкий уровень триглицеридов ( $1.2 \pm 0.4$  vs  $1.4 \pm 0.8$  vs  $1.7 \pm 0.6$ ,  $p \leq 0.05$ ) (рис. 4а) и ГИП натошак ( $114.8 \pm 61.3$  vs  $289.0 \pm 159.3$ ,  $p \leq 0.05$ ), чем в группе с понижением уровня ГИП после завтрака. Кроме того, у пациентов



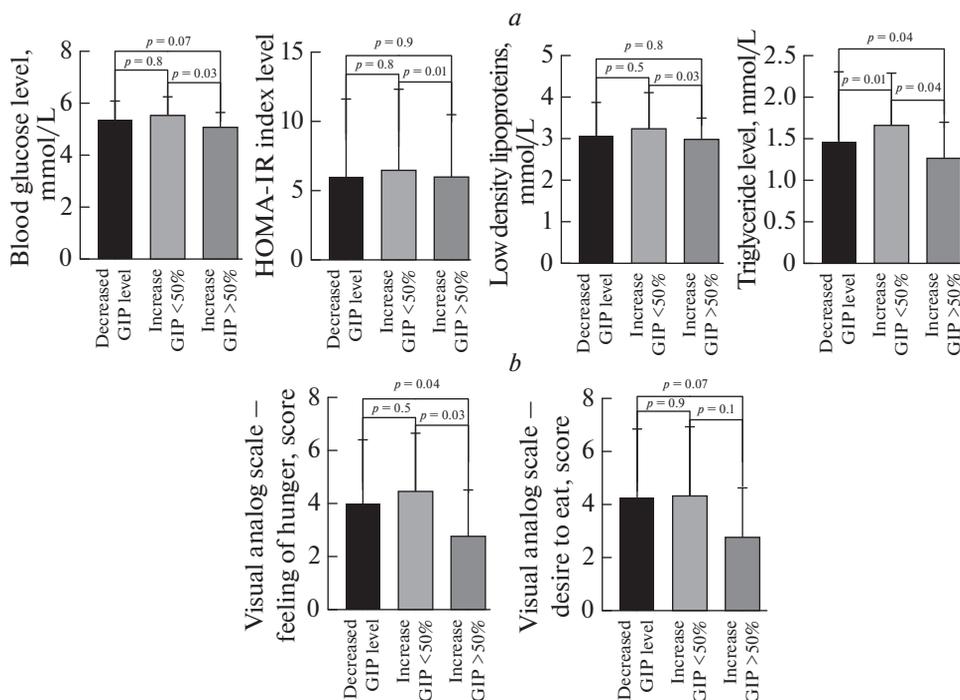
**Рис. 3.** Различия уровня триглицеридов и грелина у пациентов с различной динамикой ГПП-1 после стандартного углеводного завтрака.

данной группы по визуально-аналоговой шкале выявлено меньшее чувство голода и желания есть ( $2.8 \pm 1.7$  vs  $4.0 \pm 2.4$  vs  $4.5 \pm 2.2$ ,  $p \leq 0.05$ ) (рис. 4b).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в нашем исследовании данные по распределению различных типов пищевого поведения при ожирении совпадает с данными литературы [28]. Наиболее частым типом нарушения пищевого поведения был эмоциональный. Следует отметить, что этот тип ассоциирован с наихудшим ответом на различные варианты вмешательств, направленных на снижение веса [29]. Различные авторы отмечали в два раза меньшую потерю веса в программах изменения образа жизни [30, 31], отсутствие целевой потери веса на ГПП-1 [32], меньшую потерю веса после бариатрических вмешательств [33].

Наши данные совпадают с данными других исследований в отношении тощакового уровня лептина. Для этого гормона характерно повышение уровня по мере увеличения ИМТ [34]. Кроме того, имеются гендерные различия в его уровне — у женщин уровень лептина значимо выше, чем у мужчин. В постпищевом статусе как у мужчин, так и у женщин с ожирением, мы отметили значимое снижение уровня лептина после нагрузки углеводами в целом по группе, что совпадает с результатами ряда недавних исследований [6, 7]. В отличие от этих исследовательских групп мы проанализировали внутригрупповые различия и отметили, что лишь у меньшей части пациентов с ожирением уровень лептина после стандартного углеводного завтрака снижались (16.7%). У большинства обследованных уровень лептина не изменялся по сравнению с исходным после нагрузки (39.4%) или повышался (43.9%). Нарастание патологической динамики (снижение лептина после углеводного завтрака) было ассоциировано с большей массой тела и, что интересно — с большей окружностью бедер. Из метаболических параметров были выявлены отличия в уровне глюкозы натощак, который имел тенденцию к повышению в группе со снижением лептина после завтрака. Кроме того, постпищевая динамика лептина проявила ассоциацию с характеристиками пищевого поведения. При этом балл по шкале ЭМПП был самым высоким в группе с повышением лептина после углеводной нагрузки. Чувство голода, напротив, было наименее выражено в этой



**Рис. 4.** Различия уровней глюкозы крови, индекса HOMA-IR, липопротеидов низкой плотности, триглицеридов (а) и чувства голода/насыщения по визуально-аналоговой шкале (б) у пациентов с различной динамикой ГИП после стандартного углеводного завтрака.

группе. Интересно, что в сравнении с другими группами группа со снижением лептина в постпищевом статусе характеризовалась значениями уровней грелина и ГПП-1 в крови натощак, наиболее близкими к показателям у здоровых людей.

При оценке постпищевой динамики уровня грелина мы отметили сохранение адекватного изменения его уровня менее чем у половины пациентов (39.2%). Уровень грелина имел отрицательную взаимосвязь с уровнем ГПП-1 как натощак, так и после пищевой нагрузки. Эти результаты хорошо соотносятся с полученными ранее другими исследователями данными о подавлении продукции грелина ГПП-1 [35]. Наши данные дополнили эти результаты, показав, что в постпищевом статусе это влияние сохраняется и постпищевое повышение ГПП-1 вносит свой вклад в адекватное снижение уровня грелина после еды. В группе со снижением грелина уровень триглицеридов был достоверно ниже ( $p \leq 0.05$ ), а уровень HOMA-B выше ( $p \leq 0.05$ ). Так же как и для ГПП-1, для грелина отмечены признаки лучшего метаболического здоровья в группе с адекватной постпищевой динамикой его уровня. В недавнем исследовании, сравнившем уровень грелина натощак в группах с метаболически здоровым ожирением и с метаболическим синдромом, не было выявлено значимых межгрупповых различий. Так же, как и в нашем исследовании, авторы этой работы не выявили связи между уровнем грелина натощак и аппетитом [36].

Лишь небольшая часть обследованных пациентов имела сохраненный ответ инкретинов на пищевую нагрузку: уровень ГПП-1 адекватно (более чем на 50%) повышался у 10.8% обследованных, а уровень ГИП – у 21.4%. При этом группы с адекватным повышением как уровня ГПП-1, так и уровня ГИП, характеризова-

лись более низким уровнем триглицеридов. Кроме того, у пациентов с адекватным повышением уровня ГИП имелись менее выраженное чувство голода и желание есть. Базальные уровни инкретинов в этих группах были значимо ниже, а уровень грелина был выше, то есть они были ближе к базальным уровням контрольной группы.

Таким образом, наши данные демонстрируют наличие различных подтипов по постпищевой динамике уровня гормонов, вовлеченных в регуляцию аппетита и энергетический баланс. Те подтипы, которые согласно данным литературы, наиболее типичны для пациентов с ожирением и отражают развивающуюся при ожирении резистентность к этим гормонам и/или их дефицит, имеют худшие характеристики метаболического здоровья. В нашей выборке эти различия в основном касались уровня триглицеридов, который был значительно ниже практически во всех подгруппах с нормальной, в соответствии с данными литературы, динамикой после углеводной нагрузки. Между тем, включенные в наше исследование пациенты исходно не имели выраженных изменений метаболических параметров, что затрудняло выявление значительных различий в этой довольно небольшой группе. Дальнейшие исследования на выборках большего объема и с большей выраженностью метаболических отклонений необходимы для уточнения роли этих различий в постпищевой динамике гормонов в формировании метаболически здоровых и метаболически нездоровых типов ожирения и нарушений пищевого поведения.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.Ю.Б.), рекрутинг пациентов, сбор и статистическая обработка данных (Г.А.М.), написание и редактирование манускрипта (А.Ю.Б., Г.А.М.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kemps E, Herman CP, Hollitt S, Polivy J, Prichard I, Tiggemann M* (2016) The role of expectations in the effect of food cue exposure on intake. *Appetite* 103: 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.04.026>
2. *Travagli RA, Anselmi L* (2016) Vagal neurocircuitry and its influence on gastric motility. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13(7): 389–401. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.76>
3. *Тихоненко ЕВ, Цой ЮА, Васильева ЕЮ, Бабенко АЮ* (2018) Особенности пищевого поведения и уровень гормонов, регулирующих аппетит у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и индексом массы тела более 35 кг/м<sup>2</sup>. *Ожирение и обмен веществ* 15(1): 30–38. [*Tichonenko EV, Tsoi UA, Vasilieva EY, Babenko AYU* (2018) Characteristics of eating behavior and the level of hormones regulating the appetite in patients with type 2 diabetes mellitus and body mass index more than 35 kg /m<sup>2</sup>. *Obesity and metabolism* 15(1): 30–38. (In Russ)]. <https://doi.org/10.14341/omet2018130-38>
4. *Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML* (2007) The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 8(1):21–34. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x>
5. *Monteleone P, Martiadis V, Fabrazzo M, Serritella C, Maj M* (2003) Ghrelin and leptin responses to food ingestion in bulimia nervosa: implications for binge-eating and compensatory be-

- haviours. *Psychol Med* 33(8): 1387–1394.  
<https://doi.org/10.1017/s0033291703008316>
6. *Adamska-Patruno E, Ostrowska L, Goscik J, Fiedorczuk J, Moroz M, Kretowski A, Gorska M* (2019) The Differences in Postprandial Serum Concentrations of Peptides That Regulate Satiety/Hunger and Metabolism after Various Meal Intake, in Men with Normal vs. Excessive BMI. *Nutrients* 11(3): 493.  
<https://doi.org/10.3390/nu11030493>
  7. *Larsen MA, Isaksen VT, Paulssen EJ, Goll R, Florholmen JR* (2019) Postprandial leptin and adiponectin in response to sugar and fat in obese and normal weight individuals. *Endocrine* 66(3): 517–525.  
<https://doi.org/10.1007/s12020-019-02102-9>
  8. *Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K* (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762): 656–660.  
<https://doi.org/10.1038/45230>
  9. *Williams DL, Cummings DE* (2005) Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *J Nutr* 135(5): 1320–1325.  
<https://doi.org/10.1093/jn/135.5.1320>
  10. *Zwirska-Korczała K, Konturek SJ, Sadowski M, Wylezol M, Kuka D, Sowa P, Adamczyk-Sowa M, Kukla M, Berdowska A, Rehfeld JF, Bielanski W, Brzozowski T* (2007) Basal and postprandial plasma levels of PYY, ghrelin, cholecystokinin, gastrin and insulin in women with moderate and morbid obesity and metabolic syndrome. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 1: 13–35.
  11. *McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE* (2004) Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab* 89(4): 1630–1635.  
<https://doi.org/10.1210/jc.2003-031572>
  12. *Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS* (2004) Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89(3): 1319–1324.  
<https://doi.org/10.1210/jc.2003-031267>
  13. *Holst JJ, Deacon CF* (2005) Glucagon-like peptide-1 mediates the therapeutic actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetologia* 48(4): 612–615.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-005-1705-7>
  14. *Spreckley E, Murphy KG* (2015) The L-Cell in Nutritional Sensing and the Regulation of Appetite. *Front Nutr* 2: 23.  
<https://doi.org/10.3389/fnut.2015.00023>
  15. *Hagemann D, Holst JJ, Gethmann A, Banasch M, Schmidt WE, Meier JJ* (2007) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) suppresses ghrelin levels in humans via increased insulin secretion. *Regul Pept* 143(1–3): 64–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.03.002>
  16. *Hong X, Zhang H, Liang H, Li D, Huang J, Li Z, Jiang S, Zhang W, Xu G* (2016) Exendin-4 decreases ghrelin levels through mTOR signaling. *Mol Cell Endocrinol* 437: 201–212.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.039>
  17. *Clemmensen C, Chabenne J, Finan B, Sullivan L, Fischer K, Küchler D, Sehrer L, Ograjsek T, Hofmann SM, Schriever SC, Pfluger PT, Pinkstaff J, Tschöp MH, Dimarchi R, Müller TD* (2014) GLP-1/glucagon coagonism restores leptin responsiveness in obese mice chronically maintained on an obesogenic diet. *Diabetes* 63(4): 1422–1427.  
<https://doi.org/10.2337/db13-1609>
  18. *Jepsen EW, Lundgren J, Dirksen C, Jensen JE, Pedersen O, Hansen T, Madsbad S, Holst JJ, Torrekov SS* (2014) Treatment with a GLP-1 receptor agonist diminishes the decrease in free plasma leptin during maintenance of weight loss. *Int J Obes (Lond)* 39(5): 834–841.  
<https://doi.org/10.1038/ijo.2014.177>
  19. *Шестакова ЕА, Ильин АВ, Шестакова МВ, Дедов ИИ* (2015) Глюкозозависимый инсулинотропный полипептид – новое звено в развитии ожирения. Ожирение и обмен веществ 12(1):16–19. [*Shestakova EA, Il'in AV, Shestakova MV, Dedov II* (2015) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide – a new link in the development of obesity. Obesity and metabolism 12(1): 16–19. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.14341/omet2015116-19>
  20. *Simpson KA, Martin NM, Bloom SR* (2008) Hypothalamic regulation of appetite. *Expert Rev Endocrinol Metab* 577–592.  
<https://doi.org/10.1586/17446651.3.5.577>
  21. *Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Takahira N, Matsunaga A, Aoyama N, Masuda T, Izumi T* (2010) Elevated circulating levels of an incretin hormone, glucagon-like peptide-1, are associated with metabolic

- components in high-risk patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 9: 17.  
<https://doi.org/10.1186/1475-2840-9-17>
22. Finan B, Müller TD, Clemmensen C, Perez-Tilve D, DiMarchi RD, Tschöp MH (2016) Reappraisal of GIP Pharmacology for Metabolic Diseases. *Trends Mol Med* 22(5): 359–376.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.03.005>
23. Møller CL, Vistisen D, Færch K, Johansen NB, Witte DR, Jonsson A, Pedersen O, Hansen T, Lauritzen T, Jørgensen ME, Torekov SS, Holst JJ (2016) Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Is Associated With Lower Low-Density Lipoprotein But Unhealthy Fat Distribution, Independent of Insulin: The ADDITION-PRO Study. *J Clin Endocrinol Metab* 101(2): 485–493.  
<https://doi.org/10.1210/jc.2015-3133>
24. Verdich C, Toubro S, Buemann B, Lysgård Madsen J, Juul Holst J, Astrup A (2001) The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety-effect of obesity and weight reduction. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25(8): 1206–1214.  
<https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801655>
25. Carr RD, Larsen MO, Jelic K, Lindgren O, Vikman J, Holst JJ, Deacon CF, Ahrén B (2009) Secretion and dipeptidyl peptidase-4-mediated metabolism of incretin hormones after a mixed meal or glucose ingestion in obese compared to lean, nondiabetic men. *J Clin Endocrinol Metab* 95(2): 872–878.  
<https://doi.org/10.1210/jc.2009-2054>
26. Góralaska J, Rażny U, Polus A, Dziewiońska A, Gruca A, Zdzienicka A, Dembińska-Kieć A, Solnica B, Micek A, Kapusta M, Słowińska-Solnica K, Malczewska-Malec M (2020) Enhanced GIP Secretion in Obesity Is Associated with Biochemical Alteration and miRNA Contribution to the Development of Liver Steatosis. *Nutrients* 12(2): 476.  
<https://doi.org/10.3390/nu12020476>
27. Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Takahira N, Matsunaga A, Aoyama N, Masuda T, Izumi T (2010) Elevated circulating levels of an incretin hormone, glucagon-like peptide-1, are associated with metabolic components in high-risk patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 9: 17.  
<https://doi.org/10.1186/1475-2840-9-17>
28. Ganley RM (1989) Emotion and eating in obesity: A review of the literature. *Int J Eat Disord* 343–361.  
[https://doi.org/10.1002/1098-108X\(198905\)8:3<343::AID-EAT2260080310>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1098-108X(198905)8:3<343::AID-EAT2260080310>3.0.CO;2-C)
29. Frayn M, Knäuper B (2018) Emotional Eating and Weight in Adults: a Review. *Curr Psychol* 37: 924–933.  
<https://doi.org/10.1007/s12144-017-9577-9>
30. López-Guimerà G, Dashi HS, Smith CE, Sánchez-Carracedo D, Ordovas JM (2014) CLOCK 3111 T/C SNP Interacts with Emotional Eating Behavior for Weight-Loss in a Mediterranean Population. *PLoS One* 9(6): e99152.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099152>
31. Delahanty LM, Peyrot M, Shrader PJ, Williamson DA, Meigs JB, Nathan DM (2013) DPP Research Group. Pretreatment, psychological, and behavioral predictors of weight outcomes among lifestyle intervention participants in the Diabetes Prevention Program (DPP). *Diabetes Care* 36(1): 34–40.  
<https://doi.org/10.2337/dc12-0733>
32. van Ruiten CC, Ten Kulve JS, van Bloemendaal L, Nieuwdorp M, Veltman DJ, IJzerman RG (2022) Eating behavior modulates the sensitivity to the central effects of GLP-1 receptor agonist treatment: a secondary analysis of a randomized trial. *Psychoneuroendocrinology* 137: 105667.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2022.105667>
33. Canetti L, Berry EM, Elizur Y (2009) Psychosocial predictors of weight loss and psychological adjustment following bariatric surgery and a weight-loss program: the mediating role of emotional eating. *Int J Eat Disord* 42(2): 109–117.  
<https://doi.org/10.1002/eat.20592>
34. Shufen Li, Xi Li (2016) Leptin in normal physiology and leptin resistance. *Sci Bull* 61(19): 1480–1488.  
<https://doi.org/10.1007/s11434-015-0951-4>
35. Hagemann D, Holst JJ, Gethmann A, Banasch M, Schmidt WE, Meier JJ (2007) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) suppresses ghrelin levels in humans via increased insulin secretion. *Regul Pept* 143(1–3): 64–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.03.002>
36. Mesgari-Abbasi M, AbbasalizadFarhangi M (2020) Serum concentrations of cholecystokinin, peptide YY, ghrelin and high sensitive C-reactive protein in association with metabolic syndrome ingredients in obese individuals. *Acta Endocrinol (Buchar)* 16(1): 37–42.  
<https://doi.org/10.4183/aeb.2020.37>

## **Imbalance in the Response of Hormones Involved in the Regulation of Energy Balance in Obesity Patients – Study of Contribution to Eating Disorders and Metabolic Parameters**

**A. Yu. Babenko<sup>a, \*</sup>, and G. A. Matveev<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

*\*e-mail: alina\_babenko@mail.ru*

In healthy people in post-eating status, there is a natural dynamics of the level of hormones involved in the regulation of eating behavior and energy balance. Data in obese patients are heterogeneous. The aim of our study was to study the nature of the dynamics of changes in the level of hormones (leptin, ghrelin, GLP-1, GIP) and to establish their relationship with factors characterizing the metabolic status and eating behavior. 66 obese patients (12 men and 54 women), mean age  $37.8 \pm 10.8$  years, average body weight  $105.2 \pm 16.7$  kg, BMI  $37.3 \pm 4.8$  kg/m<sup>2</sup> were included in the study. All patients underwent anthropometric examination, measurement of blood pressure, of parameters of carbohydrates and lipides metabolism. The studied hormones (leptin, GIP, GLP-1, ghrelin) were estimated on fasting and 60 minutes after a standard breakfast containing 60 g of carbohydrates. In our study, we noted that different obese patients have multidirectional changes in the levels of the studied hormones. In some patients, the dynamics typical of healthy people remain, in the majority – either a weakening of post-nutrition peaks (in 48.2% of the examined patients, a weakening of the GLP-1 peak, in 50% – a weakening of the GIP peak), or abnormal dynamics (no decrease in ghrelin levels in 60.8%, no increase in leptin in 83.3%). Pathological dynamics of hormone levels in the post-nutrition status was associated with more pronounced changes in parameters reflecting the metabolically unhealthy type (elevated glucose and triglyceride levels, elevated HOMA-IR index) and violations of eating behaviour.

*Keywords:* leptin resistance, ghrelin resistance, glucagon-like peptide 1, glucose-dependent insulintropic peptide, obesity, eating behaviour

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ДОЗЫ  
ГОНАДОТРОПИНА ПРИ ЛЕЧЕНИИ АНДРОГЕННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ  
У САМЦОВ КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-го ТИПА© 2022 г. А. А. Бахтукнов<sup>1, \*</sup>, И. Ю. Морина<sup>1</sup>, К. В. Деркач<sup>1</sup>, И. В. Романова<sup>1</sup>,  
В. Н. Сорокоумов<sup>1, 2</sup>, А. О. Шпаков<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия<sup>2</sup>Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: bahtyukov@gmail.com

Поступила в редакцию 08.07.2022 г.

После доработки 04.08.2022 г.

Принята к публикации 10.08.2022 г.

При сахарном диабете 1-го типа (СД1) синтез тестостерона в семенниках нарушается, что ведет к андрогенной недостаточности и нарушению сперматогенеза. Длительное использование высоких доз гонадотропинов для их коррекции приводит к снижению чувствительности рецептора лютеинизирующего гормона/хорионического гонадотропина человека (ЛГ/ХГЧ) в клетках Лейдига. Целью работы было изучить влияние трехдневной обработки самцов крыс Вистар с СД1, вызванным стрептозотоцином (45 мг/кг), с помощью аллостерического агониста рецептора ЛГ/ХГЧ 5-амино-N-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотиномидо)фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксиамида (ТП03, 15 мг/кг в сутки) на эффекты относительно низкой дозы ХГЧ (10 МЕ/крысу, однократно, п/к) на уровень тестостерона в крови, экспрессию генов стероидогенеза и морфометрические показатели семенных канальцев. Предобработка СД1-крыс ТП03 усиливала стимулирующий эффект ХГЧ на уровень тестостерона в крови. Причиной подобного эффекта с одной стороны является усиление стероидогенеза за счет повышения экспрессии гена *Cyp11a1*, кодирующего фермент цитохром P450<sub>scs</sub>, ответственный за первый этап синтеза тестостерона, а с другой стороны – улучшение тестикулярной чувствительности к гонадотропинам за счет повышения содержания рецептора ЛГ/ХГЧ в семенниках СД1-крыс. Кроме того, предобработка ТП03 с последующей стимуляцией ХГЧ демонстрировала более выраженное улучшение морфометрических показателей семенных канальцев по сравнению с группами, получавшими только ТП03 или ХГЧ. Тем самым, ТП03 позволяет повысить эффективность стероидогенного эффекта ХГЧ и снизить дозу гонадотропина, компенсирующую андрогенную недостаточность при диабете.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1-го типа, стероидогенез, аллостерический регулятор, рецептор лютеинизирующего гормона, гонадотропин

DOI: 10.31857/S0869813922090023

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) приводит к нарушению метаболизма и множества физиологических функций, затрагивая почти все системы организма. Одним из ключевых направлений в клинической эндокринологии является изучение нарушений у мужчин-пациентов с СД1, возникающих в гипоталамо-гипофизарно-

тестикулярной оси и приводящих к андрогенной недостаточности. Мощным триггером к появлению таких нарушений являются гипергликемия, инсулиновая резистентность и воспалительные процессы [1]. В условиях СД1 снижается синтез тестостерона тестикулярными клетками Лейдига и нарушается процесс созревания сперматозоидов, что ведет к снижению фертильности [2, 3]. У крыс с СД1 снижается экспрессия и количество белка StAR (Steroidogenic acute regulatory protein, ген *Star*), ответственного за транспорт холестерина в митохондрии, где осуществляется первые стадии тестикулярного стероидогенеза. При СД1 в семенниках снижаются экспрессия и активность ферментов – цитохрома P450<sub>ssc</sub>, катализирующего превращение холестерина в прегненолон (ген *Cyp11a1*), и цитохрома P450<sub>c17</sub>, превращающего прогестерон в 17-ОН-прогестерон и далее в андростендион (ген *Cyp17a1*), что приводит к дефициту тестостерона [4, 5]. Не менее фатальными для функционирования репродуктивной системы при СД1 являются изменения морфологии семенных канальцев семенников, которые выражаются в уменьшении толщины герминативного эпителия семенных канальцев, а также значительное снижение количества сперматогенных клеток, что ведет к тяжелым нарушениям сперматогенеза [6, 7].

Длительное применение высоких доз препаратов гонадотропинов, хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ) снижает чувствительность клеток Лейдига к эндогенному ЛГ, следствием чего является значимое снижение продукции тестостерона после окончания лечения [8]. Альтернативой гонадотропинам являются низкомолекулярные аллостерические агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ, созданные на основе тиено[2,3-*d*]-пиримидина, которые взаимодействуют с аллостерическим сайтом, локализованным в трансмембранном домене рецептора. Показана способность ряда соединений, в том числе одного из наиболее активных и селективных, Org 43553, активировать рецептор ЛГ/ХГЧ и стимулировать синтез тестостерона у самцов крыс [9]. Нами ранее разработана серия производных тиено[2,3-*d*]-пиримидина, в том числе наиболее активные из них – соединения ТП03 и ТП04, которые с высокой эффективностью стимулировали тестикулярный стероидогенез при парентеральном и пероральном способах введения [10]. В отличие от гонадотропинов, они не снижали ответ клеток Лейдига на эндогенный ЛГ [11, 12]. Наряду с этим, соединения ТП03 и ТП04 стимулировали тестикулярный стероидогенез у самцов крыс со стрептозотоциновым диабетом [11–13]. Имеются данные о способности тиено[2,3-*d*]-пиримидиновых производных функционировать как низкомолекулярные шапероны, которые активируют рецепторы ЛГ/ХГЧ внутри клетки и(или) облегчают транслокацию мутантных и неправильно свернутых рецепторов к плазматической мембране [14]. На основании этого можно предположить, что предобработка животных тиено[2,3-*d*]-пиримидиновыми производными будет усиливать действие гонадотропинов, снижая их эффективную дозу, причем в наибольшей степени этот эффект будет выявляться в условиях патологических изменений в семенниках, в том числе при СД1.

Целью работы было изучить эффект трехдневной предобработки самцов крыс с СД1 с помощью 5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-*d*] пиримидин-6-карбоксамид (ТП03), низкомолекулярного агониста рецептора ЛГ/ХГЧ и однократно вводимого животным ХГЧ на (1) стероидогенные эффекты, которые оценивали по уровню тестостерона в крови и по экспрессии тестикулярных генов, кодирующих ферменты, участвующие в синтезе тестостерона, (2) на уровень рецептора ЛГ/ХГЧ и его генную экспрессию, а также (3) на морфометрические показатели семенных канальцев. В качестве модели среднего по тяжести СД1 был выбран стрептозотоциновый диабет, индуцированный введением половозрелым самцам крыс средней дозы стрептозотоцина (45 мг/кг).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Моделирование сахарного диабета 1-го типа и схема эксперимента.** Для экспериментов использовали половозрелых (3 мес.) самцов крыс Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и корму. Все процедуры осуществляли в строгом соответствии с требованиями Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 7-3/2020), “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” и European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС).

СД1 вызывали инъекцией стрептозотоцина (СТЗ) в дозе 45 мг/кг (в/б, в 0.1 М цитратном буфере, рН 4.5) самцам крыс. Контрольные животные того же возраста получали только буфер. Эффективность развития СД1 оценивали через 10 дней по уровню глюкозы в крови через 2 ч после потребления стандартной кормовой смеси, отбирая животных с уровнем глюкозы выше 15 мМ. Для определения уровня глюкозы использовали глюкометр и тест-полоски “One-Touch Select Ultra” (“LifeScan”, США). Через 30 дней после индукции СД1 крыс распределяли на группы (в каждой  $n = 5$ ). Животные из групп “СД1+ТП03-1Д” и “СД1+ТП03-3Д” были обработаны с помощью ТП03, который синтезировали, как описано ранее [13]. ТП03 растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и вводили крысам в дозе 15 мг/кг/сутки (в/б) в течение одного или трех дней соответственно. Другие группы обрабатывали следующим образом: “Контроль” и “СД1” – ДМСО (300 мкл, в/б), “СД1 + ХГЧ-1Д” – ХГЧ (“Московский эндокринный завод”, Россия) однократно, в дозе 10 МЕ/крысу (п/к), “СД1 + ТП03-3Д + ХГЧ” – ТП03 (15 мг/кг/сутки, в/б, в течение трех дней) и ХГЧ (10 МЕ/крысу, п/к, однократно, на третий день эксперимента, через 30 мин после инъекции ТП03). Дозы препаратов ТП03 и ХГЧ были выбраны на основе результатов предварительных экспериментов. Доза ХГЧ была в два раза ниже той дозы (20 МЕ/крысу), при которой достигался 70%-ный стероидогенный эффект гонадотропина. Образцы плазмы получали из цельной крови, взятой из хвостовой вены крыс в первый (до и через 1, 3 и 5 ч после введения ТП03 или ДМСО) и в третий дни эксперимента (до введения препаратов, через 2 и 3.5 ч после введения ТП03 или ДМСО, или соответственно через 1.5 и 3 ч после введения ХГЧ). Образцы тканей семенников забирали после декапитации животных, которая осуществлялась под наркозом (хлоральгидрат, 400 мг/кг, в/б).

**Морфологические показатели семенников крыс.** Образцы тканей семенников фиксировали в течение 48 ч (4°C) в 4%-ном растворе параформальдегида, затем промывали 0.9%-ным натрий-фосфатным буфером (PBS) и погружали в PBS, содержащий 30% сахарозы. Далее ткани семенников замораживали на сухом льду с использованием среды Tissue-Tek (“Sacura Finetek Europe”, Нидерланды). Серии поперечных срезов (толщина 6 мкм) готовили с помощью криостата Leica CM-1520 (“Leica Biosystems”, Германия) и монтировали на стеклах SuperFrost/plus (“Menzel”, Германия). Срезы из разных экспериментальных групп помещали на одно и то же стекло, сушили на воздухе в течение ночи, а затем использовали для гистологического и иммуногистохимического анализа.

Для изучения морфологии семенных канальцев срезы семенников обрабатывали 50%-ным этанолом в течение 15 мин, промывали дистиллированной водой и окрашивали гематоксилином Малера по стандартной методике. Затем срезы снова промывали дистиллированной водой и помещали под покровное стекло с глицерином. На каждом срезе было проанализировано 10 семенных канальцев.

**Иммуноферментный и иммуногистохимический анализ.** Уровень тестостерона в образцах плазмы крови крыс определяли с помощью иммуноферментного анализа (“ИФА-Тестостерон”, “Алкор-Био”, Россия). Свежеприготовленные срезы семенников промывали PBS, обрабатывали 0.6%-ной перекисью водорода в PBS в тече-

ние 30 мин для блокирования активности эндогенной пероксидазы, далее промывали PBS в течение 10 мин, а затем PBS, содержащим 0.1% Triton X-100 (PBST) в течение 20 мин. Затем срезы инкубировали в течение 1 ч в блокирующем растворе (5%-ная козья сыворотка в PBST). Инкубацию с первичными поликлональными кроличьими антителами к ЛГР (“LSBio”, США) проводили в 1%-ном блокирующем растворе в разведении 1 : 1000 в течение ночи (22°C). После промывки PBST (40 мин) срезы инкубировали в течение 1 ч в PBST с биотин-конъюгированными вторичными антикроличьими IgG-антителами козы (“VectorLabs”, Великобритания) в разведении 1 : 600, затем промывали PBS в течение 30 мин и инкубировали в растворе стрептавидин-пероксидазы (“Sigma-Aldrich”, США) в PBS в разведении 1 : 1000 в течение 1 ч. После промывки в PBS срезы обрабатывали 0.05%-ным диаминобензидином (“Sigma-Aldrich”, США) и 0.03%-ной перекисью водорода в PBS. Реакцию останавливали промывкой дистиллированной водой, после чего срезы помещали под покровное стекло с глицерином. Специфичность иммуногистохимической реакции проверяли с использованием отрицательного контроля (образцы без первичных или вторичных антител). Микрофотографии (по 20 для каждого животного) с разных уровней семенников получали с помощью микроскопа Carl Zeiss Imager A1, объектив  $\times 20$  (“Carl Zeiss”, Германия) с использованием одинаковых оптических характеристик для разных групп животных. Оптическую плотность количественно определяли с помощью программного обеспечения Image J NIH Analysis (“National Institutes of Health”, США). На каждой микрофотографии анализировали 5 участков с клетками и оценивали оптическую плотность ЛГР-иммунопозитивного материала, выраженную в арбитражных единицах.

**Анализ генной экспрессии.** Для анализа экспрессии генов из семенников выделяли тотальную РНК с помощью реагента “ExtractRNA” (“Евроген”, Россия), затем получали кДНК с помощью реакции обратной транскрипции (“MMLV RT Kit”, “Евроген”, Россия). ПЦР в реальном времени осуществляли с помощью амплификатора “Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System” (“Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.”, США) в смеси, содержащей кДНК, 0.4 мкМ прямого и обратного специфичных праймеров, реагент “qPCR-HS SYBR + Low ROX” (“Евроген”, Россия). В работе использовали ранее описанные последовательности комплементарных прямого и обратного праймеров для генов крысы *Lhr*, *Star*, *Cyp11a1* и *Cyp17a1*, а также *Actb*, используемого в качестве референсного гена [12, 13].

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку данных осуществляли с помощью критерия Крускала–Уоллиса с дальнейшим использованием апостериорного критерия Дана для попарного сравнения групп, используя пакет программ GraphPad Prism 8 (версия 8.0.1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Характеристика диабетической модели и развитие андрогенной недостаточности.** Крысы с СД1 демонстрировали сильно выраженную гипергликемию через 2 ч после потребления пищи (“СД1” –  $21.2 \pm 3.9$  мМ, “Контроль” –  $6.3 \pm 0.4$  мМ,  $p < 0.05$ ) и снижение массы тела (“СД1” –  $241 \pm 20$  г, “Контроль” –  $327 \pm 18$  г,  $p < 0.05$ ). У самцов крыс с СД1 был снижен базовый уровень тестостерона в крови – до 38.7–45.0% от такового в контроле, что свидетельствует о развитии андрогенной недостаточности (табл. 1, А). В семенниках диабетических крыс экспрессия генов *Star*, *Cyp11a1* и *Cyp17a1*, кодирующих белок StAR и цитохромы P450<sub>scs</sub> и P450<sub>c17</sub>, была снижена соответственно до 30.0, 30.0 и 34.4% от ее уровня в контроле (рис. 1). При изучении относительного уровня мРНК гена *Lhr*, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ в семенниках крыс с СД1, отличий выявлено не было. Однако при иммуногистохимическом анализе рецептора ЛГ/ХГЧ было показано снижение уровня белка для

**Таблица 1.** Уровни тестостерона в крови крыс с СД1 при однократном введении им ТП03, аллостерического агониста рецептора ЛГ/ХГЧ (А), а также в условиях трехдневной обработки животных ТП03, в том числе в сочетании с однократно вводимым ХГЧ (Б)

А. Однократное введение ТП03 самцам крыс с СД1				
Группа/время (ч)	0	1	3	5
“Контроль”	12.70 (10.94–17.98)	17.11 (10.99–25.27)	13.43 (6.55–16.91)	13.25 (6.88–17.29)
“СД1”	5.72 (3.55–9.29) <sup>а</sup>	7.02 (1.89–12.43) <sup>а</sup>	4.52 (3.14–9.88) <sup>а</sup>	5.13 (4.23–11.67) <sup>а</sup>
“СД1 + ТП03”	6.12 (4.45–7.69) <sup>а</sup>	12.37 (10.06–27.88)	20.20 (13.08–30.01) <sup>б</sup>	11.88 (8.72–22.22)
Б. Уровни тестостерона в крови крыс на третий день их обработки ТП03 или ДМСО и однократной стимуляции ХГЧ				
Группа/время (ч)	0	2	3.5	
“Контроль”	13.54 (8.51–15.73)	15.24 (10.69–16.55)	9.93 (8.67–17.09)	
“СД1”	5.70 (2.79–9.07) <sup>а</sup>	3.44 (2.96–5.38) <sup>а</sup>	3.72 (2.55–7.45) <sup>а</sup>	
“СД1 + ТП03-3Д”	9.79 (7.00–12.76)	16.13 (12.64–31.37)	18.06 (13.58–39.09)	
“СД1 + ХГЧ-1Д”	6.54 (2.81–12.49) <sup>а</sup>	18.30 (4.08–29.26)	36.81 (24.39–71.37) <sup>б</sup>	
“СД1 + ТП03-3Д + ХГЧ”	5.47 (4.76–11.39) <sup>а</sup>	43.00 (27.37–58.71) <sup>аб</sup>	47.01 (41.79–77.82) <sup>аб</sup>	

А. ТП03 или его растворитель ДМСО вводили в 11.00, образцы крови забирали в 10.00 (до введения, точка “0”) и через 1, 3 и 5 ч после введения. Уровень тестостерона измеряли в плазме крови крыс (нмоль/л). Б. ТП03 или его растворитель ДМСО вводили в 11.00, ХГЧ – через 30 мин после инъекции ТП03 или ДМСО. Образцы крови забирали в 10.00 (до введения, точка “0”) и через 2 и 3.5 ч после введения ТП03. <sup>а</sup> – отличия от группы “Контроль”, <sup>б</sup> – от группы “СД1” статистически значимы при  $p < 0.05$ , данные представлены как медиана, максимальное и минимальное значение,  $n = 5$ .

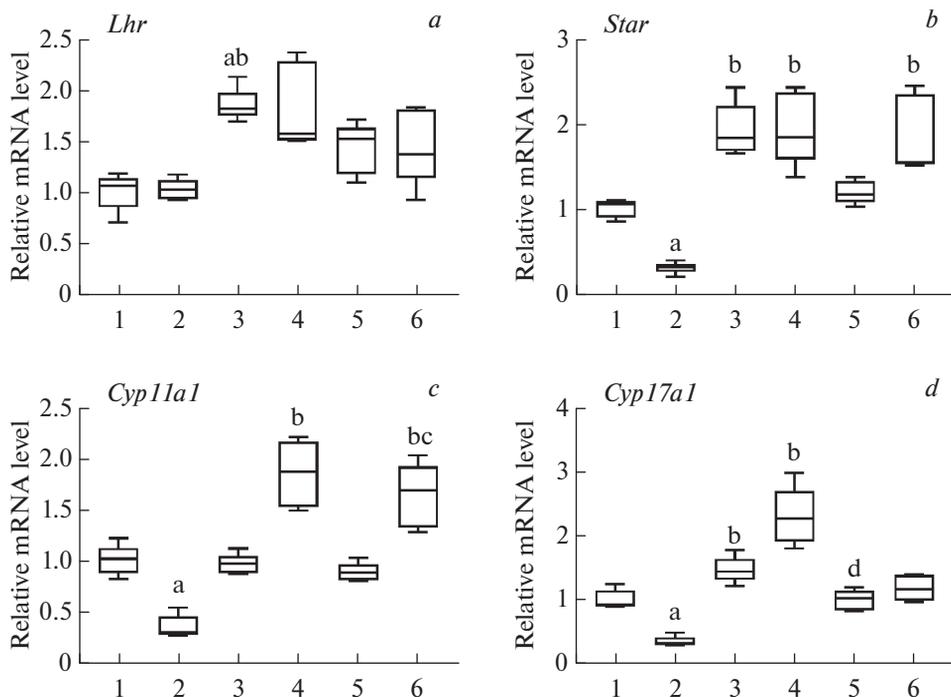
**Таблица 2.** Эффекты однократного введения ТП03 и ХГЧ, а также трехдневной обработки ТП03 с последующей однократной стимуляцией ХГЧ на высоту эпителия семенных канальцев, количество сперматогониев и пахитеновых сперматоцитов в семенниках СД1-крыс

	Высота эпителия, мкм	Количество сперматогониев	Количество пахитеновых сперматоцитов
“Контроль”	71.0 (57.5–83.0)	64.5 (55.0–77.0)	58.50 (44.0–69.0)
“СД1”	60.7 (50.0–74.5) <sup>а</sup>	58.5 (45.0–71.0) <sup>а</sup>	52.0 (42.0–60.0) <sup>а</sup>
“СД1 + ТП03-1Д”	68.0 (52.0–82.0) <sup>аб</sup>	63.0 (42.0–71.0) <sup>аб</sup>	53.5 (43.0–67.0) <sup>а</sup>
“СД1 + ХГЧ-1Д”	67.5 (52.5–78.0) <sup>аб</sup>	61.5 (48.0–82.0) <sup>аб</sup>	53.0 (34.0–65.0) <sup>а</sup>
“СД1 + ТП03-3Д”	67.0 (52.0–80.0) <sup>аб</sup>	60.5 (51.0–69.0) <sup>а</sup>	54.5 (39.0–64.0) <sup>а</sup>
“СД1 + ТП03-3Д + ХГЧ”	68.0 (56.5–81.0) <sup>аб</sup>	66.0 (44.0–85.0) <sup>bcd</sup>	56.5 (37.0–72.0) <sup>б</sup>

<sup>а</sup> – отличия от группы “Контроль”, <sup>б</sup> – от группы “СД1”, <sup>с</sup> – от группы “СД1 + ТП03-3Д”, <sup>д</sup> – от группы “СД1 + ХГЧ-1Д” статистически значимы при  $p < 0.05$ , данные представлены как медиана, максимальное и минимальное значение,  $n = 50$ .

этого рецептора на 18% относительно контроля (рис. 2). Гистологический анализ тканей семенников СД1-крыс показал уменьшение высоты герминативного эпителия семенных канальцев на 15.5%, а количества сперматогониев и пахитеновых сперматоцитов на 10.1 и 11.1% соответственно (табл. 2). Таким образом, у самцов с экспериментальным СД1 наряду с метаболическими нарушениями наблюдались значительное ослабление стероидогенеза и сперматогенеза.

**Эффекты агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ на стероидогенез и сперматогенез СД1-крыс.** Аллостерический агонист рецептора ЛГ/ХГЧ ТП03 через 3 ч после однократного введения стимулировал повышение уровня тестостерона у СД1-крыс на 347% (табл. 1, А). Однократная обработка ХГЧ приводила к повышению уровня тестостерона на 890% через 3 ч после введения. Трехдневная обработка крыс с помощью ТП03 восстанавливала уровень тестостерона до контрольных значений (табл. 1, Б). Введение ХГЧ крысам, которые получали ТП03 в течение трех дней, приводило к повышению уровня тестостерона на 1125% уже через 1.5 ч после инъекции гонадо-

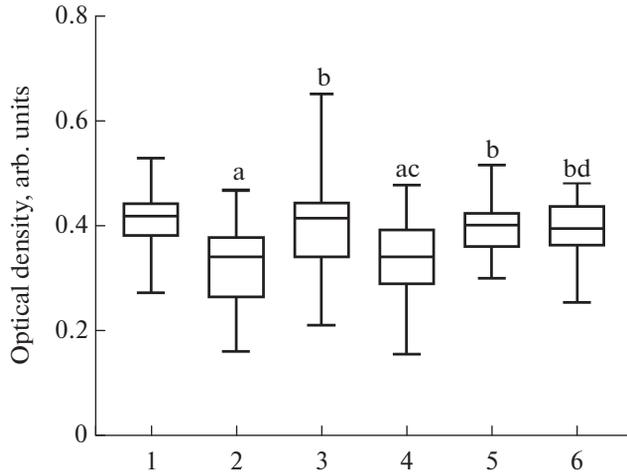


**Рис. 1.** Экспрессия генов *Lhr* (a), *Star* (b), *Cyp11a1* (c) и *Cyp17a1* (d) в семенниках самцов крыс с СД1 при однократном введении им ТП03 или ХГЧ, а также в условиях трехдневной обработки ТП03, в том числе в сочетании с однократно вводимым ХГЧ.

Ткани семенников были взяты через 3.5 ч после введения ТП03 (соответственно через 3 ч после введения ХГЧ) в последний день эксперимента. 1 – “Контроль” (ДМСО, в/б), 2 – “СД1” (ДМСО, в/б), 3 – “СД1 + ТП03-1Д”, однократное введение ТП03 (15 мг/кг/сутки, в/б), 4 – “СД1 + ХГЧ-1Д”, однократное введение ХГЧ (10 МЕ/крысу, п/к), 5 – “СД1 + ТП03-3Д”, введение ТП03 (15 мг/кг/сутки, в/б) в течение трех дней, 6 – “СД1 + ТП03-3Д + ХГЧ” введение ТП03 (15 мг/кг/сутки, в/б) в течение трех дней и однократное введение ХГЧ (10 МЕ/крысу, п/к) на третий день эксперимента. Экспрессия генов нормирована относительно референсного гена (*Actb*). <sup>a</sup> – отличия от группы “Контроль”, <sup>b</sup> – от группы “СД1”, <sup>c</sup> – от группы “СД1+ТП03-3Д”, <sup>d</sup> – от группы “СД1 + ХГЧ-1Д” статистически значимы при  $p < 0.05$ , данные представлены как медиана, 25 и 75 процентиль (“боксы”), минимальное и максимальное значение (“усы”),  $n = 5$ .

тропина. Через 3 ч после введения ХГЧ (3.5 ч после последней инъекции ТП03) уровень тестостерона в этой группе был на 1163% выше, чем в группе “СД1” (табл. 1, Б). При этом у животных в группах “СД1 + ХГЧ-1Д” и “СД1 + ТП03-3Д” уровень тестостерона хоть и имел тенденцию к повышению, но не достигал достоверных различий через 1.5 ч после введения ХГЧ и 2 ч после введения ТП03.

Изучение экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию тестикулярного стероидогенеза у диабетических крыс показало, что однократные инъекции ТП03 и ХГЧ повышали экспрессию генов *Star* на 42.4 и 42.7% и *Cyp17a1* на 35.9 и 59.2% соответственно. Кроме того, в ответ на однократное введение ХГЧ экспрессия *Cyp11a1* повышалась на 45.2% (рис. 1). Трехдневное введение ТП03 оказывало менее выраженный эффект на экспрессию генов *Star*, *Cyp11a1* и *Cyp17a1* по сравнению с однократной стимуляцией ТП03 или ХГЧ. Введение ХГЧ крысам с СД1, обработанных ТП03, уси-



**Рис. 2.** Изменение оптической плотности иммунофлуоресценции рецептора ЛГ/ХГЧ в семенниках СД1-крыс в ходе предобработки ТПО3 и однократной стимуляцией ХГЧ.

1 – “Контроль” (ДМСО, в/б), 2 – “СД1” (ДМСО, в/б), 3 – “СД1 + ТПО3-1Д”, однократное введение ТПО3 (15 мг/кг/сутки, в/б), 4 – “СД1 + ХГЧ-1Д”, однократное введение ХГЧ (10 МЕ/крысу, п/к), 5 – “СД1 + ТПО3-3Д”, введение ТПО3 (15 мг/кг/сутки, в/б) в течение трех дней, 6 – “СД1 + ТПО3-3Д + ХГЧ” введение ТПО3 (15 мг/кг/сутки, в/б) в течение трех дней и однократное введение ХГЧ (10 МЕ/крысу, п/к) на третий день эксперимента. <sup>a</sup> – отличия от группы “Контроль”, <sup>b</sup> – от группы “СД1”, <sup>c</sup> – от группы “СД1 + ТПО3-3Д”, <sup>d</sup> – от группы “СД1 + ХГЧ-1Д” статистически значимы при  $p < 0.05$ , данные представлены как медиана, 25 и 75 процентиль (“боксы”), минимальное и максимальное значение (“усы”),  $n = 50$ .

ливалось эффект на экспрессию *Syp11a1* по сравнению с группой “СД1 + ТПО3-3Д”, но при этом значение генной экспрессии были сопоставимы с таковым одного ХГЧ. Эффекты стимуляции ХГЧ на фоне предобработки ТПО3 оказывали сопоставимое влияние на экспрессию гена *Syp17a1* в сравнении с группой, обработанной ТПО3, но без ХГЧ (рис. 1).

Однократное введение ТПО3 и ХГЧ СД1-крысам приводило к восстановлению некоторых морфологических характеристик семенных канальцев, сниженных при СД1, практически до их показателей в контроле. Высота герминативного эпителия увеличилась на 11 и 10% соответственно, а количество сперматогониев повышалось на 7.2 и 5% под действием агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ (табл. 2). Трехдневное введение ТПО3 СД1-крысам повлияло лишь на высоту эпителия семенников, которая увеличилась на 10%. Предобработка крыс ТПО3 и дальнейшая однократная стимуляция с помощью ХГЧ привели к значительному улучшению морфологических характеристик семенных канальцев у диабетических крыс, что выражалось в повышении количества пахитеновых сперматоцитов на 8% по сравнению с группой “СД1”. Количество сперматогониев в группе “СД1 + ТПО3-3Д + ХГЧ” увеличилось на 11% и было достоверно выше соответствующих значений в группах с трехдневным введением ТПО3 и однократным введением ХГЧ. Наравне с этим, высота герминативного эпителия в семенных канальцах в группе с предобработкой ТПО3 увеличилась на 11%, что было сопоставимо с подобными значениями в группах “СД1 + ХГЧ-1Д” и “СД1 + ТПО3-3Д” (табл. 2).

**Эффекты ТПО3 и ХГЧ на экспрессию и клеточное содержание рецептора ЛГ/ХГЧ.** При изучении эффектов ТПО3 и ХГЧ на стероидогенез в клетках Лейдига, было

также исследовано их влияние на экспрессию *Lhr*, гена, кодирующего рецептор ЛГ/ХГЧ. Было показано, что однократное введение ТПО3 приводит к повышению генной экспрессии рецептора ЛГ/ХГЧ на 41.5%. При этом трехдневная обработка СД1-крыс ТПО3 и их дальнейшая стимуляция с помощью ХГЧ не вызывали такого выраженного повышения экспрессии гена *Lhr* (рис. 1). При иммуногистохимическом исследовании тканей семенников было показано повышение уровня рецептора ЛГ/ХГЧ в группе “СД1 + ТПО3-1Д” на 17% по сравнению с группой “СД1”. Содержание рецептора ЛГ/ХГЧ в группах “СД1 + ТПО3-3Д” и “СД1 + ТПО3-3Д + ХГЧ” увеличивалось на 15 и 13% соответственно по сравнению с группой “СД1” (рис. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нарушение тестикулярного стероидогенеза и сперматогенеза являются частыми спутниками диабетической патологии, что подтверждено многочисленными исследованиями как на моделях животных, так и клиническими данными, полученными на человеке [1–3, 15–18]. Гипергликемия, инсулиновая резистентность, воспалительные процессы, нарушения процессинга и посттрансляционных модификаций белков при СД1 являются главными причинами дисфункций мужской репродуктивной системы [1]. Одним из основных показателей, характеризующих ослабление работы гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси при диабетической патологии является снижение уровня тестостерона в крови. В использованной нами модели стрептозотоцинового СД1 при оценке динамики суточного изменения уровня гормона снижение уровня тестостерона в крови крыс находилось в пределах 38.7–45.0%, что определяет релевантность использования данной модели для изучения андрогенного дефицита, вызванного СД (табл. 1, А). Снижение уровня тестостерона в крови является следствием нарушений процессов стероидогенеза, которые протекают преимущественно в клетках Лейдига семенников. Основными причинами андрогенного дефицита при экспериментальном СД являются гипергликемия, окислительный стресс и воспалительные процессы. Также одной из причин снижения уровня тестостерона в крови самцов крыс может быть токсический эффект стрептозотоцина, который он оказывает на клетки печени, вызывая снижение синтеза холестерина гепатоцитами. Одними из ключевых звеньев в системе стероидогенеза, чьи функции нарушаются при СД, являются транспорт холестерина в митохондрии и некоторые этапы синтеза гормона. Белок StAR, транспортирующий холестерин в митохондрии, представляет собой основную мишень при гормональной регуляции синтеза тестостерона, а цитохромы P450<sub>ssc</sub> и P450<sub>c17</sub> являются ключевыми ферментами, катализирующими реакции превращения холестерина в прегненолон и прогестерона в 17-гидроксипрогестерон и далее в андростендион соответственно [5]. Нами показано значительное снижение экспрессии генов *Star*, *Cyp11a1* и *Cyp17a1*, кодирующих StAR и цитохромы P450<sub>ssc</sub> и P450<sub>c17</sub> в семенниках крыс с СД1 (рис. 1), что хорошо соотносится как с ранее полученными нашими данными [11, 12], так и с данными литературы о подобных нарушениях стероидогенеза в экспериментальных диабетических моделях [4, 5].

Ослабление стероидогенеза в семенниках при диабетической патологии может быть также связано с нарушением рецепции гонадотропных гормонов тканями семенников, вызванными нарушениями синтеза и процессинга рецептора ЛГ/ХГЧ. С помощью иммуногистохимического анализа нами показано уменьшение содержания рецептора ЛГ/ХГЧ в тканях семенников СД1-крыс (рис. 2), однако уровень мРНК *Lhr* у диабетических животных не отличался от контроля (рис. 1а), хотя в литературе есть данные, показывающие ослабление экспрессии *Lhr* при экспериментальных моделях СД [19]. Подобные различия в экспрессии генов и количестве “зрелого” белка в клетке могут быть связаны с нарушением процессинга и пост-

трансляционных модификаций белка вследствие усиления стресса эндоплазматического ретикула при диабетической патологии, что может стимулировать компенсаторное повышение экспрессии мРНК рецептора [20].

Нарушение сперматогенеза при диабетической патологии связано с одной стороны с инсулиновой резистентностью, воспалительными процессами и окислительным стрессом, а с другой — с ослаблением тестикулярного стероидогенеза. Многочисленные работы показывают изменения целого ряда морфологических параметров семенников. Прежде всего это нарушение структуры семенных канальцев, уменьшение их диаметра и толщины эпителиального слоя [15–17]. Следствием этого становится уменьшение и структурная дезорганизация клеток, обеспечивающих начальные этапы сперматогенеза: сперматогониев и первичных сперматоцитов [17]. Нами были показаны значительные нарушения морфологии семенных канальцев у СД1-крыс, которые выражались в уменьшении таких морфометрических параметров как толщина герминативного эпителия, число сперматогониев и пахитеновых сперматоцитов, что отражает ослабление сперматогенной системы у крыс при СД1 (табл. 2).

Использование препаратов гонадотропинов для коррекции андрогенной недостаточности наравне с тестостерон-заместительной терапией является одним из немногих способов поддержания нормального уровня тестостерона у мужчин с нарушениями фертильности [21, 22]. Однако наличие широкого списка противопоказаний у пациентов с диабетической патологией значительно ограничивает возможности их применения. Нами были разработаны и системно исследованы соединения на основе тиенопиримидиновых производных, которые обладали активностью агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ [10–13]. Связываясь с аллостерическим сайтом, локализованным в трансмембранном домене рецептора, они вызывают его активацию, при этом не конкурируя с гонадотропными гормонами, взаимодействующими с эктодоменом рецептора. Важной в практическом отношении особенностью наиболее активных соединений ТП03 и ТП04 была способность оказывать стабильный стероидогенный эффект не только при однократном введении, но и при обработке в течение 5–7 дней без существенного снижения чувствительности тканей семенников к действию эндогенного ЛГ. Это выражалось в сохранении высокого уровня экспрессии мРНК *Lhr* и количества рецепторов ЛГ/ХГЧ в клетках семенников при введении ТП03 и ТП04, в то время как хроническое введение препарата ХГЧ в дозировке 20 МЕ/крысу, оказывающей 70–80% от максимального эффекта препарата, приводило к значительному снижению как генной экспрессии, так и содержания рецептора в клетке, следствием чего было ослабление стимулирующего эффекта препарата на тестикулярный стероидогенез [11–13].

Мы предположили, что предобработка в течение трех дней одним из наиболее активных из разработанных нами аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ — ТП03 может привести к усилению эффекта хорионического гонадотропина, взятого в более низкой дозе 10 МЕ/крысу на тестикулярный стероидогенез у крыс, нарушенный вследствие диабетической патологии, но при этом не приведет к снижению чувствительности рецепторного аппарата клеток Лейдига к действию эндогенного ЛГ. Нами было показано, что предобработка СД1-крыс с помощью ТП03 в течение трех дней вызывает усиление эффекта на уровень тестостерона в крови однократной инъекции ХГЧ, взятого в сравнительно низкой дозе 10 МЕ/крысу (табл. 1, В). При этом, выраженный стимулирующий эффект наблюдается уже через 1.5 ч после введения ХГЧ и 2 ч после последней инъекции ТП03. Однако через 3 ч после введения ХГЧ различия в значениях уровня тестостерона в группах “СД1 + ХГЧ” и “СД1 + ТП03-3Д + ХГЧ” становятся менее выраженными. Изучив генную экспрессию в семенниках СД1-крыс нами было показано, что влияние однократной и трехдневной обработки животных с помощью ТП03 имеет существенные отличия.

Однократное введение ТПОЗ оказывает сопоставимое влияние на экспрессию генов *Star* и *Cyp17a1* в сравнении с животными, обработанными однократной дозой ХГЧ (рис. 1). При трехдневной обработке с помощью ТПОЗ мы наблюдали менее выраженный эффект на экспрессию генов *Star*, кодирующий одноименный транспортный белок и *Cyp17a1*, катализирующего превращение предшественников в синтезе тестостерона прогестерона в 17-гидроксипрогестерон и далее в андростендион. Аналогичные значения уровня мРНК гена *Cyp17a1* были получены в группе “СД1 + ТПОЗ-3Д + ХГЧ”. Таким образом, в группах с трехдневной обработкой ТПОЗ не наблюдается повышения экспрессии гена *Cyp17a1* в отличие от групп с однократным введением ТПОЗ или ХГЧ, что может быть следствием влияния петли отрицательной обратной связи, сдерживающей избыточное повышение уровня тестостерона, либо обусловлено разнонаправленной модуляцией ТПОЗ и ХГЧ транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию генов стероидогенеза. Также в группе “СД1 + ТПОЗ-3Д + ХГЧ” мы наблюдали усиление экспрессии гена *Cyp11a1*, кодирующего фермент, катализирующий первую реакцию в цепи превращений холестерина в тестостерон в сравнении с группой “СД1 + ТПОЗ-3Д”, но не с группой “СД1 + ХГЧ-1Д” (рис. 1). Усиление экспрессии *Cyp11a1* в группе “СД1 + ТПОЗ-3Д + ХГЧ” может отчасти объяснить усиление эффекта ХГЧ на фоне предобработки ТПОЗ на уровень тестостерона в крови СД1-крыс.

Ранее нами было показано, что один из наиболее многообещающих эффектов аллостерического агониста рецептора ЛГ/ХГЧ ТПОЗ — это отсутствие снижения генной экспрессии *Lhr* при однократной и многодневной обработке, следствием чего было сохранение чувствительности тканей семенников к эффектам эндогенного ЛГ. В данной работе нами показано увеличение как генной экспрессии *Lhr* (рис. 1а), так и уровня белка ЛГ/ХГЧ при однократном введении ТПОЗ (рис. 2). При трехдневной обработке ТПОЗ в группах “СД1 + ТПОЗ-3Д” и “СД1 + ТПОЗ-3Д + ХГЧ” мы наблюдали увеличения только уровня белка рецептора ЛГ/ХГЧ, без изменения генной экспрессии. Повышение уровня рецептора ЛГ/ХГЧ, сниженном у крыс с СД1, может быть одной из основных причин усиления эффекта ХГЧ на фоне предобработки ТПОЗ.

Далее мы исследовали влияние препаратов ТПОЗ и ХГЧ на морфологические параметры семенников, нарушенные вследствие диабетической патологии. Даже однократные инъекции ТПОЗ или ХГЧ вызывали улучшение морфологических характеристик: высоты герминативного эпителия, количества сперматогониев, но не влияли на число пахитеновых сперматоцитов. Трехдневная обработка ТПОЗ приводила к повышению высоты герминативного эпителия, тогда как другие характеристики хоть и имели тенденции к повышению, но не были статистически значимыми. При этом только в группе “СД1 + ТПОЗ-3Д + ХГЧ” мы наблюдали полное восстановление количества пахитеновых сперматоцитов и сперматогониев до их уровня у контрольных животных, в то время как толщина герминативного эпителия семенных канальцев не превышала соответствующих значений у групп с однократным введением ХГЧ или трехдневным введением ТПОЗ (табл. 2).

Таким образом, нами впервые показано, что трехдневная предобработка крыс с андрогенным дефицитом, вызванным СД1, с помощью ТПОЗ приводит к усилению стимулирующего эффекта однократно введенного ХГЧ, взятого в относительно низкой дозе (10 МЕ/крысу), на уровень тестостерона в крови, и это сопровождается повышением экспрессии гена *Cyp11a1* в семенниках. Это может быть обусловлено показанными нами повышением уровня белка рецептора ЛГ/ХГЧ в семенниках. Кроме того, предобработка СД1-крыс с помощью ТПОЗ усиливала восстанавливающие эффекты ХГЧ на морфологические параметры семенных канальцев в семенниках диабетических животных, повышая некоторые из них до контрольных значений. Использование аллостерических агонистов рецептора ЛГ/ХГЧ на осно-

ве тиенопиримидиновых производных может способствовать снижению дозировок препаратов гонадотропных гормонов, что имеет большое значение в клинической эндокринологии и во вспомогательных репродуктивных технологиях.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-20122). Биохимические и молекулярно-биологические исследования проводились на базе центра коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований при Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.О.Ш., К.В.Д. В.Н.С. и А.А.Б.), сбор данных (А.А.Б., И.В.Р. и И.Ю.М.), обработка данных (А.А.Б., И.В.Р., К.В.Д., И.Ю.М.), написание и редактирование манускрипта (А.А.Б., И.В.Р., К.В.Д. и А.О.Ш.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Maresch CC, Stute DC, Alves MG, Oliveira PF, de Kretser DM, Linn T* (2018) Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review. *Hum Reprod Update* 24(1): 86–105.  
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmx033>
2. *Rato L, Alves MG, Duarte AI, Santos MS, Moreira PI, Cavaco JE, Oliveira PF* (2015) Testosterone deficiency induced by progressive stages of diabetes mellitus impairs glucose metabolism and favors glycolysis in mature rat Sertoli cells. *Int J Biochem Cell Biol* 66: 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.001>
3. *Skurikhin EG, Pakhomova AV, Pershina OV, Krupin VA, Ermakova NN, Pan ES, Kudryashova AI, Ermolaeva LA, Khmelevskaya ES, Goldberg VE, Zhdanov VV, Dygai AM* (2017) Role of Sertoli and Leydig cells in the regulation of spermatogonial stem cell and development of reproductive disorders in male C57Bl/6 mice with type 1 diabetes mellitus. *Bull Exp Biol Med* 64(2): 127–131.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-017-3940-6>
4. *Khamis T, Abdelalim AF, Abdallah SH, Saeed AA, Edress NM, Arisha AH* (2020) Early intervention with breast milk mesenchymal stem cells attenuates the development of diabetic-induced testicular dysfunction via hypothalamic Kisspeptin/Kiss1r-GnRH/GnIH system in male rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 866(1): 165577.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165577>
5. *Wagner IV, Klötting N, Savchuk I, Eifler L, Kulle A, Kralisch-Jäcklein S, Dötsch J, Hiort O, Svehnikov K, Söder O* (2021) Diabetes type 1 negatively influences Leydig cell function in rats, which is partially reversible by insulin treatment. *Endocrinology* 162(4): bqab017.  
<https://doi.org/10.1210/endo/bqab017>
6. *Barsiah S, Behnam-Rassouli M, Shahabipour F, Rostami S, Sabbaghi MA, Momeni Z, Tavassoli A, Sahebkar A* (2019) Evaluation of testis hormonal and histopathological alterations in type I and type II diabetic rats. *J Cell Biochem* 120(10): 16775–16785.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.28936>
7. *Keyhanmanesh R, Hamidian G, Alipour MR, Oghbaei H* (2019) Beneficial treatment effects of dietary nitrate supplementation on testicular injury in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Reprod Biomed Online* 39(3): 357–371.  
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.027>
8. *Veldhuis JD, Liu PY, Takahashi PY, Keenan DM* (2012) Dynamic testosterone responses to near-physiological LH pulses are determined by the time pattern of prior intravenous LH infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: 720–728.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00200.2012>

9. *van Koppen CJ, Zaman GJ, Timmers CM, Kelder J, Mosselman S, van de Lagemaat R, Smit MJ, Hanssen RG* (2008) A signaling-selective, nanomolar potent allosteric low molecular weight agonist for the human luteinizing hormone receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 378(5): 503–514.  
<https://doi.org/10.1007/s00210-008-0318-3>
10. *Derkach KV, Dar'in DV, Bakhtyukov AA, Lobanov PS, Shpakov AO* (2016) In vitro and in vivo studies of functional activity of new low molecular weight agonists of the luteinizing hormone receptor. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A: Membr Cell Biol* 10(4): 294–300.  
<https://doi.org/10.1134/S1990747816030132>
11. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Stepochkina AM, Shpakov AO, Dar'in DV* (2019) A low molecular weight agonist of the luteinizing hormone receptor stimulates adenyl cyclase in the testicular membranes and steroidogenesis in the testes of rats with type 1 diabetes. *Biochemistry (Mosc) Suppl Ser A: Membr Cell Biol* 13(4): 301–309.  
<https://doi.org/10.1134/S1990747819040032>
12. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Gureev MA, Dar'in DV, Sorokoumov VN, Romanova IV, Morina IY, Stepochkina AM, Shpakov AO* (2020) Comparative study of the steroidogenic effects of human chorionic gonadotropin and thieno[2,3-D]pyrimidine-based allosteric agonist of luteinizing hormone receptor in young adult, aging and diabetic male rats. *Int J Mol Sci* 21(20): 7493.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21207493>
13. *Bakhtyukov AA, Derkach KV, Sorokoumov VN, Stepochkina AM, Romanova IV, Morina IY, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO* (2022) The effects of separate and combined treatment of male rats with type 2 diabetes with metformin and orthosteric and allosteric agonists of luteinizing hormone receptor on steroidogenesis and spermatogenesis. *Int J Mol Sci* 23(1): 198.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23010198>
14. *Newton CL, Whay AM, McArdle CA, Zhang M, van Koppen CJ, van de Lagemaat R, Segaloff DL, Millar RP* (2011) Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor mutants with an allosterically binding small-molecule agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(17): 7172–7176.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1015723108>
15. *Mardanshahi T, Rezaei N, Zare Z, Malekzadeh Shafaroudi M, Mohammadi H* (2018) Effects of L-Carnitine on the sperm parameters disorders, apoptosis of spermatogenic cells and testis histopathology in diabetic Rats. *Int J Reprod Biomed* 17(5): 325–336.  
<https://doi.org/10.18502/ijrm.v17i5.4600>
16. *Pourheydar B, Azarm F, Farjah G, Karimipour M, Pourheydar M* (2022) Effect of silymarin and metformin on the sperm parameters and histopathological changes of testes in diabetic rats: An experimental study. *Int J Reprod Biomed* 19(12): 1091–1104.  
<https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i12.10060>
17. *Omolaoye TS, Skosana BT, du Plessis SS* (2018) Diabetes mellitus- induction: Effect of different streptozotocin doses on male reproductive parameters. *Acta Histochem* 120(2): 103–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.12.005>
18. *He Z, Yin G, Li QQ, Zeng Q, Duan J* (2021) Diabetes mellitus causes male reproductive dysfunction: a review of the evidence and mechanisms. *In Vivo* 35(5): 2503–2511.  
<https://doi.org/10.21873/invivo.12531>
19. *Shoorei H, Khaki A, Shokoohi M, Khaki AA, Alihemmati A, Moghimian M, Abtahi-Eivary SH* (2020) Evaluation of carvedilol on pituitary and sexual hormones and their receptors in the testicle of male diabetic rats. *Hum Exp Toxicol* 39(8): 1019–1030.  
<https://doi.org/10.1177/0960327120909525>
20. *Dombroski BA, Nayak RR, Ewens KG, Ankener W, Cheung VG, Spielman RS* (2010) Gene expression and genetic variation in response to endoplasmic reticulum stress in human cells. *Am J Hum Genet* 86(5): 719–729.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.03.017>
21. *Shiraishi K, Matsuyama H* (2017) Gonadotropin actions on spermatogenesis and hormonal therapies for spermatogenic disorders [Review]. *Endocr J* 64(2): 123–131.  
<https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0001>
22. *Fink J, Schoenfeld BJ, Hackney AC, Maekawa T, Horie S* (2021) Human chorionic gonadotropin treatment: a viable option for management of secondary hypogonadism and male infertility. *Expert Rev Endocrinol Metab* 16(1): 1–8.  
<https://doi.org/10.1080/17446651.2021.1863783>

**Development of Approaches to Reduce the Effective Dose of Gonadotropin in the Treatment of Androgen Insufficiency in Male Rats with Type 1 Diabetes Mellitus****A. A. Bakhtyukov<sup>a, \*</sup>, I. Yu. Morina<sup>a</sup>, K. V. Derkach<sup>a</sup>, I. V. Romanova<sup>a</sup>,  
V. N. Sorokoumov<sup>a, b</sup>, and A. O. Shpakov<sup>a</sup>**<sup>a</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia*<sup>b</sup>*Institute of Chemistry, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia**\*e-mail: bahtyukov@gmail.com*

In type 1 diabetes mellitus (DM1), testosterone synthesis in the testes is impaired, leading to androgen insufficiency and disorder of spermatogenesis. Long-term use of high doses of gonadotropins for their correction leads to a decrease in the sensitivity of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin (LH/hCG) receptors in Leydig cells. The aim of this work was to study the effect of three-day treatment of male Wistar rats with type 1 diabetes induced by streptozotocin (45 mg/kg) with the allosteric LH/hCG receptor agonist 5-amino-*N*-*tert*-butyl-2-(methylsulfanyl)-4-(3-(nicotinamido)phenyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxamide (TP03, 15 mg/kg per day) on the effects of a relatively low dose of hCG (10 IU/rat, single dose, s.c.) on testosterone levels in the blood, expression of steroidogenesis genes and morphometric parameters of the seminiferous tubules. Pretreatment of rats with TP03 enhanced the stimulatory effect of hCG on testosterone level. The reason for this effect, on the one hand, is an increase in steroidogenesis due to an increase in the expression of the *Cyp11a1* gene, which encodes the cytochrome P450<sub>scc</sub> enzyme responsible for the first stage of testosterone synthesis and, on the other hand, an improvement in testicular sensitivity to gonadotropins due to an increase in the content of the LH/hCG receptor in the testes of DM1 rats. In addition, pretreatment of DM1-rats with TP03 followed by hCG stimulation demonstrated a more pronounced improvement in the morphometric parameters of the seminiferous tubules as compared with the groups that received only TP03 or hCG. Thus, TP03 makes it possible to increase the effectiveness of the steroidogenic effect of hCG and reduce the dose of gonadotropin, which compensates for an androgen deficiency in diabetes.

**Keywords:** type 1 diabetes mellitus, steroidogenesis, allosteric regulator, luteinizing hormone receptor, gonadotropins

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА  
НА БЕЛОК-ТРАНСПОРТЕР Р-ГЛИКОПРОТЕИН

© 2022 г. А. А. Слепнев<sup>1</sup>, А. В. Шулькин<sup>1</sup>, Ю. В. Абаленихина<sup>1</sup>, \*, Н. М. Попова<sup>1</sup>,  
И. В. Черных<sup>1</sup>, Е. Н. Якушева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России,  
Рязань, Россия

\*E-mail: abalenihtina88@mail.ru

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 12.08.2022 г.

Принята к публикации 15.08.2022 г.

Р-гликопротеин (Pgp) – эффлюксный мембранный белок-транспортер, играющий важную роль в фармакокинетике лекарственных веществ. Известно, что тестостерон может снижать активность и количество Pgp, однако механизмы его действия остаются неизученными. Цель исследования – изучить механизмы влияния тестостерона на функционирование Pgp, в частности оценить роль андрогенного (AR), прегнан Х (PXR) и конститутивного андростанового рецепторов (CAR) в данном процессе *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* на клетках линии Caco-2 воздействие тестостерона (1 и 10 мкМ) в течение 24 ч снижало количество Pgp (метод вестерн-блот) по сравнению с контролем. Ингибитор PXR – кетоконазол (1 и 10 мкМ, экспозиция 24 ч) не влиял на количество Pgp, а ингибитор CAR – CINPA в концентрации 10 мкМ уменьшал содержание Pgp. Комбинация CINPA 10 мкМ и тестостерона 10 мкМ также снижала содержание Pgp, однако количество транспортера достоверно не отличалось от показателей групп изолированного применения тестостерона и CINPA. *In vivo* на кроликах-самцах породы Шиншилла показано, что однократное внутримышечное введение тестостерона ундеканоеата в дозе 24 мг/кг массы повышало уровень тестостерона в сыворотке крови на 21-е сутки исследования по сравнению с контролем, а после выполнения орхиэктомии его содержание на 21-е сутки снижалось. Относительное количество Pgp и CAR в тощей кишке кроликов при введении тестостерона уменьшалось, а после выполнения орхиэктомии – увеличивалось. Количество PXR и AR в тощей кишке кроликов в указанных группах статистически значимо не изменялось. Таким образом, в опытах *in vitro* и *in vivo* показано, что тестостерон снижает количество белка-транспортера Pgp, ингибируя CAR.

**Ключевые слова:** Р-гликопротеин, тестостерон, клетки линии Caco-2, прегнан Х рецептор, конститутивный андростановый рецептор, андрогенный рецептор, вестерн-блот

DOI: 10.31857/S0869813922090059

Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1), белок суперсемейства ABC-транспортеров, который экспрессируется в цитоплазматических мембранах и препятствует проникновению своих субстратов внутрь клеток, выводя их в межклеточное пространство и биологические жидкости [1]. Доказана локализация Pgp в энтероцитах кишечника, гепатоцитах, эпителии почечных канальцев, эндотелии гистогематических барьеров, эндокринных и опухолевых клетках. При этом максимальная экспрессия

гена *MDR1*, кодирующего данный белок, обнаружена в надпочечниках и тонком кишечнике [2]. Исходя из данной локализации, принято считать, что основными функциями Pgp являются транспорт эндогенных веществ (стероидные, тиреоидные гормоны), развитие резистентности опухолей к химиотерапевтическим агентам (за счет их эффлюкса из опухолевых клеток) и участие в фармакокинетике (всасывании, распределении и выведении) лекарственных веществ [3].

Показано, что активность Pgp может изменяться под действием ряда веществ и факторов внешней и внутренней среды. Так, гипоксия [4], окислительный стресс [5], рифампицин [6] повышают активность транспортера, а прогестерон [7], кетоназол и амиодарон [6] ее снижают. Регуляция активности Pgp имеет важное практическое значение. Ингибиторы синтеза и активности транспортера могут использоваться в комплексной терапии онкологических заболеваний (подавление функционирования Pgp повышает проникновение цитостатиков внутрь клеток) [8], а изучение влияния лекарственных веществ на активность Pgp важно для прогнозирования межлекарственных взаимодействий. Ингибирование транспортера в клетках кишечника, печени и почек может привести к повышению в крови концентрации его субстратов и развитию побочных эффектов фармакотерапии (посредством повышения всасывания и замедления выведения), а повышение активности Pgp в данных органах – наоборот, к уменьшению уровня субстратов и снижению эффективности лечения (путем снижения всасывания и ускорения выведения) [3]. Наибольшее клиническое значение имеют субстраты Pgp антикоагулянты – дабигатрана этексилат, ривароксабан, изменение концентрации которых в плазме крови может привести к кровотечению или к развитию тромбозов соответственно [6]. Поэтому актуальным является тестирование принадлежности лекарственных и биологически активных веществ к субстратам, индукторам и ингибиторам Pgp.

В ряде исследований было показано, что тестостерон может влиять на активность и количество Pgp. В эксперименте на рогахвицах новозеландских кроликов было установлено, что тестостерон в концентрациях 100 и 150 мкМ не влиял на опосредованный Pgp транспорт эритромицина через рогахвицу, однако в концентрациях 250 и 500 мкМ ингибировал активность белка-транспортера, при этом  $IC_{50}$  (концентрация, ингибирующая активность Pgp на 50%) составила  $241 \pm 27.6$  мкМ [9]. В эксперименте на культуре клеток 2780AD (карцинома яичника человека, вариант, резистентный к лекарственной терапии) показано, что тестостерон в концентрациях 50–150 мкМ ингибировал активность Pgp, оцениваемую по эффлюксу субстрата белка-транспортера – даунорубицина [10]. В исследовании на линии клеток VBL-resistant cell lines, J7.VI-1 выявлено, что тестостерон в концентрации 50 мкМ уменьшал содержание белка-транспортера в мембранах микросом на 45% [11]. В опытах на изолированных участках двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок крыс установлено, что тестостерон в концентрации 20 мкМ повышал всасывание субстрата Pgp – винбластина в двенадцатиперстной и тощей кишках, что свидетельствует о его способности ингибировать белок-транспортер [12]. В эксперименте на самках крыс линии Sprague-Dawley было показано, что введение им тестостерона в дозе 10 мг/день в течение 7 дней приводило к снижению экспрессии (вестерн-блот) и активности Pgp, оцениваемой по билиарному клиренсу доксорубицина до показателей самцов [13]. На кроликах породы Шиншилла нами было показано, что введение тестостерона вызывало уменьшение количества и активности Pgp в тонком кишечнике, а орхиэктомия, наоборот, повышала количество и активность транспортера [14, 15].

Таким образом, в большинстве исследований доказано, что тестостерон снижает активность и количество Pgp. Однако механизмы выявленных изменений на данный момент не известны. Цель исследования – изучить механизмы влияния тестос-

стерона на функционирование белка-транспортера Pgp, в частности оценить роль андрогенного, прегнан X и конститутивного андростанового рецепторов в данном процессе.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все процедуры выполнены с участием животных и соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации. Протокол исследования был рассмотрен и утвержден на заседании биоэтической комиссии Рязанского государственного медицинского университета Минздрава России № 12 от 08.04.16 г.

Исследование выполнено *in vitro* и *in vivo*. Для экспериментов *in vitro* использовалась линия клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5%-ном содержании CO<sub>2</sub> в инкубаторе WS-189C (“World Science”, Корея) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л) (“Sigma-Aldrich”, Германия), с добавлением L-глутамин (4 мМ) (“Sigma-Aldrich”, Германия), 15% эмбриональной бычьей сыворотки (“Sigma-Aldrich”, Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (“Sigma-Aldrich”, Германия) соответственно. Для определения количества Pgp клетки культивировали в 6-луночных планшетах в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Pgp [16].

В ходе исследования *in vitro* было сформировано пять экспериментальных групп. При выполнении каждого эксперимента было выполнено по 3 повторения ( $n = 3$ ). Первая группа – контроль, представлена клетками линии Caco-2, которые инкубировали в питательной среде без добавления тестируемых веществ ( $n = 3$ ). Вторая группа – оценка влияния тестостерона на количество Pgp, включала клетки линии Caco-2, которые инкубировали с тестостероном в концентрациях 1 и 10 мкМ в течение 24 ч ( $n = 3$ ). Третья группа – изучение влияния ингибирования прегнан X рецептора (PXR) на количество Pgp, представляла собой клетки линии Caco-2, которые инкубировали с кетоконазолом (ингибитор PXR, “Sigma Aldrich”, Германия) в концентрациях 1 и 10 мкМ в течение 24 ч ( $n = 3$ ) [17]. Четвертая группа – исследование влияния ингибирования конститутивного андростанового рецептора (CAR) на количество Pgp – клетки линии Caco-2 инкубировали с 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-добензо[b,f]азепин-3-[ил]этиловым эфиром карбаминовой кислоты (CINPA 1, ингибитор CAR, “Tocris”, Великобритания) в концентрациях 1 и 10 мкМ в течение 24 ч ( $n = 3$ ) [18]. Выбор данного ингибитора обусловлен его селективностью по отношению к CAR и отсутствием влияния на PXR, например, в отличие от другого ингибитора 1-(2-хлорофенил)-N-метил-N-(1-метилпропил)-3-изохинолинкарбоксамид (PK11195). Пятая группа – оценка влияния комбинации 10 мкМ CINPA и 10 мкМ тестостерона при длительности инкубации 24 ч на количество Pgp ( $n = 3$ ).

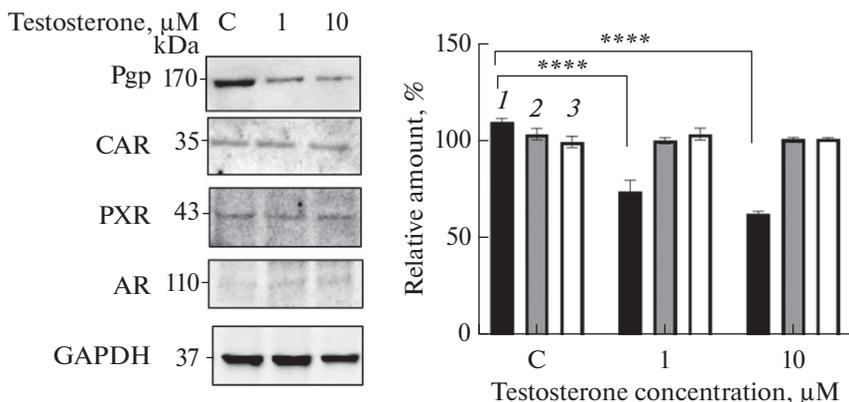
После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (“Sigma-Aldrich”, Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера (“BioRad”, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, Германия) в течение 30 мин при 4°C и постоянном перемешивании из расчета 10<sup>7</sup> клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 22440 g в течение 10 мин (“AvantiJXN-3”, “BeckmanCoulter”, США). Супернатант использовали для анализа.

Исследование *in vivo* выполнено на кроликах-самцах породы Шиншилла, массой 3000–3500 г, в возрасте 7–10 мес. Выбор вида животных обусловлен наибольшей схожестью механизмов регуляции Pgr у человека и кроликов [19, 20]. Все животные были разделены на 4 экспериментальные группы. Первая группа (контроль 1) – интактные кролики, которым внутримышечно вводили физиологический раствор в объеме, эквивалентном объему раствора тестостерона, и через 21 сутки выводили из эксперимента ( $n = 5$ ). Вторая группа – кролики, которым однократно внутримышечно вводили тестостерона ундеcanoат (раствор для внутримышечного введения “Небидо” 250 мг/мл (“Bayer Pharma AG”, Германия) в дозе 24 мг/кг массы [21] и выводили из эксперимента на 21-е сутки ( $n = 5$ ). Третья группа (контроль 2) – интактные кролики, которым выполняли “ложную” операцию и через 21 сутки выводили из эксперимента ( $n = 5$ ). Четвертая группа – кролики, которым выполняли орхиэктомию и выводили из эксперимента на 21-е сутки после операции ( $n = 5$ ). Длительность наблюдения и доза тестостерона ундеcanoата выбраны на основе ранее полученных результатов об изменении активности и количества Pgr при повышении и снижении уровня тестостерона [14, 15].

Оперативные вмешательства проводили в условиях операционной вивария Рязанского государственного медицинского университета с соблюдением методов асептики и антисептики под наркозом, который осуществляли в/м введением ксилазина гидрохлорида (“Рометар”, “СПОФА”, Чехия) в дозе 4.0–6.0 мг/кг массы и золегила-50 (“Virbac”, Франция) в дозе 5–10 мг/кг массы [22]. У всех животных перед выведением из эксперимента из ушной вены забиралась кровь и в сыворотке определяли концентрацию тестостерона радиоиммунным методом с использованием тест-систем “IMMUNOTECH” (Чехия). Концентрацию тестостерона выражали в нмоль/л.

При завершении эксперимента животных каждой серии выводили из него передозировкой золегила (“Золетил 100”, “Virbac S.A.”, Франция) в дозе 30 мг/кг массы. Для исследования забирали образец тощей кишки. Полученные образцы измельчали и гомогенизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, Германия) с помощью гомогенизатора Поттера (16–20 ударов) в соотношении масса ткани (мг) : объем буфера (мл) 1 : 1, а затем инкубировали в течение 3 ч при 4°C и постоянном перемешивании. Полученный гомогенат центрифугировали при 22440 g в течение 10 мин (“AvantiJXN-3”, “BeckmanCoulter”, США). Супернатант использовали для анализа.

В полученных лизатах и гомогенатах методом вестерн-блот оценивали относительное количество Pgr, CAR, PXR и андрогенного рецептора (AR). Для этого белки (30 мкг, количество белка анализировали методом Брэдфорда) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (“Bio-Rad”) в буферной системе Laemmli (“BioRad”). Перед загрузкой образцы обрабатывали в соответствии с протоколом Bio-Rad. Их смешивали с буфером для образцов Laemmli (“Bio-Rad”), содержащем 2.5% 2-меркаптоэтанола (“Bio-Rad”) в соотношении 1 : 3, инкубировали 5 мин при температуре 70°C. Гели прогоняли при 100 В в течение 90 мин. Для определения относительного количества Pgr, CAR, PXR и AR методом вестерн-блот использовали первичные мышинные моноклональные антитела P-Glycoprotein Antibody MA5-13854 (“Invitrogen”, США), MB67 CAR Monoclonal Antibody (“Invitrogen”, США), MA5-31808 PXR Monoclonal Antibody (1D12G1) (“Invitrogen”), США, Anti-Androgen Receptor antibody [DHTR/882] (“Abcam”, США) в разведении 1 : 200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США) в разведении 1 : 4000. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ (“Bio-Rad”, США). Молекулярная



**Рис. 1.** Относительное количество гликопротеина-P (Pgr, 1), конститутивного андростанового рецептора (CAR, 2), прегнан-Х-рецептора (PXR, 3), андрогенного рецептора (AR) в клетках линии Caco-2 при воздействии тестостерона в концентрациях 1 и 10 мкМ в течение 24 ч ( $M \pm SD$ ,  $n = 3$ ). \*\*\*\* $p < 0.0001$  по сравнению с контролем (C) (критерий Фишера).

масса белков была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, “Bio-Rad”, США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”, США). Количество Pgr, CAR, PXR, AR оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, “Invitrogen”, США, разведение 1 : 1000, вторичные антитела – вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbitanti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США, разведение 1 : 4000).

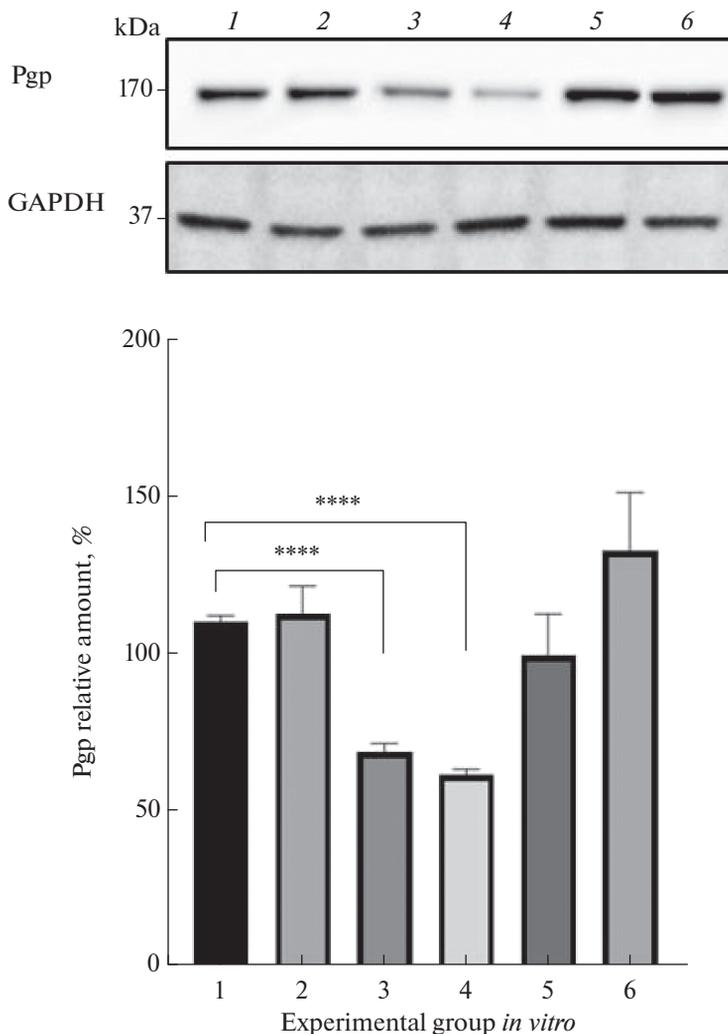
Полученные результаты анализировали с помощью программы GgraphPadPrism 8. Характер распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Учитывая, что данные имели нормальное распределение, для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA) для несвязанных выборок, попарные сравнения выполняли с помощью критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ . Результаты представлены в виде  $M \pm SD$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воздействие тестостерона на клетки линии Caco-2 в течение 24 ч приводило к снижению количества Pgr в концентрации 1 мкМ на 32.4% ( $p < 0.0001$ ), 10 мкМ на 42.9% ( $p < 0.0001$ ) по сравнению с контролем (рис. 1). В то же время уровень CAR и PXR достоверно не изменялся, а AR практически не детектировался (рис. 1).

Специфические ингибиторы CAR и PXR оказывали следующее влияние на уровень Pgr. Ингибитор PXR – кетоконазол в концентрациях 1 и 10 мкМ и экспозиции 24 ч не влиял на количество Pgr, а ингибитор CAR – CINPA в концентрации 10 мкМ снижал содержание Pgr на 37.6% ( $p < 0.0001$ ) по сравнению с контролем (рис. 2).

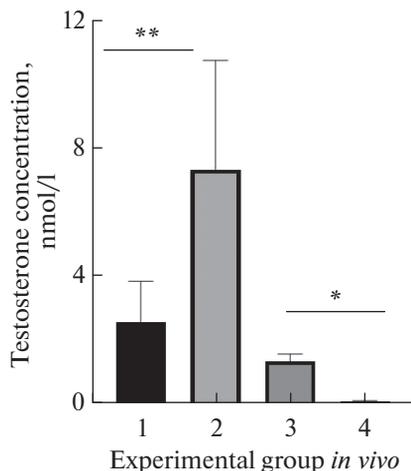
Комбинация 10 мкМ CINPA и 10 мкМ тестостерона также снижала содержание Pgr в клетках линии Caco-2 по сравнению с показателями контроля на 44.3% ( $p < 0.0001$ ), однако количество транспортера достоверно не отличалось от показателей групп изолированного применения тестостерона и CINPA (рис. 2).



**Рис. 2.** Относительное количество гликопротеина-Р (Pgp) в клетках линии Saco-2 в контроле (1), при воздействии CINPA 1 мкМ (2) и 10 мкМ (3), сочетанном применении тестостерона 10 мкМ и CINPA 10 мкМ (4), при инкубации с кетоконазолом 1 мкМ (5) и 10 мкМ (6) в течение 24 ч ( $M \pm SD$ ,  $n = 3$ ). \*\*\*\* $p < 0.0001$  по сравнению с контролем (критерий Фишера).

В эксперименте *in vivo* установлено, что внутримышечное введение тестостерона ундеcanoата кроликам в дозе 24 мг/кг массы приводило к повышению уровня тестостерона в сыворотке крови на 21-е сутки исследования на 166.7% ( $p = 0.001$ ) по сравнению с контролем 1. После выполнения орхиэктомии содержание тестостерона в сыворотке крови на 21-е сутки снижалось на 92.9% ( $p = 0.012$ ) относительно контроля 2 (рис. 3).

Относительное количество Pgp в тощей кишке кроликов при введении тестостерона ундеcanoата снижалось на 35.5% ( $p < 0.001$ ), а при выполнении орхиэктомии – увеличивалось на 50.9% ( $p < 0.01$ ) (рис. 4а). Содержание CAR в тощей кишке при использовании тестостерона ундеcanoата снижалось на 30.4% ( $p < 0.001$ ), а при выполнении орхиэктомии увеличивалось на 100% ( $p < 0.0001$ ) (рис. 4б).



**Рис. 3.** Концентрация тестостерона в сыворотке крови кроликов-самцов при внутримышечном введении физиологического раствора (1), при внутримышечном введении тестостерона ундеcanoата в дозе 24 мг/кг массы (2), при проведении “ложной” операции (3), при орхизектомии (4) на 21-е сутки ( $M \pm SD$ ,  $n = 5$ ). \* $p \leq 0.01$ ; \*\* $p \leq 0.001$  по сравнению с соответствующим контролем (критерий Фишера).

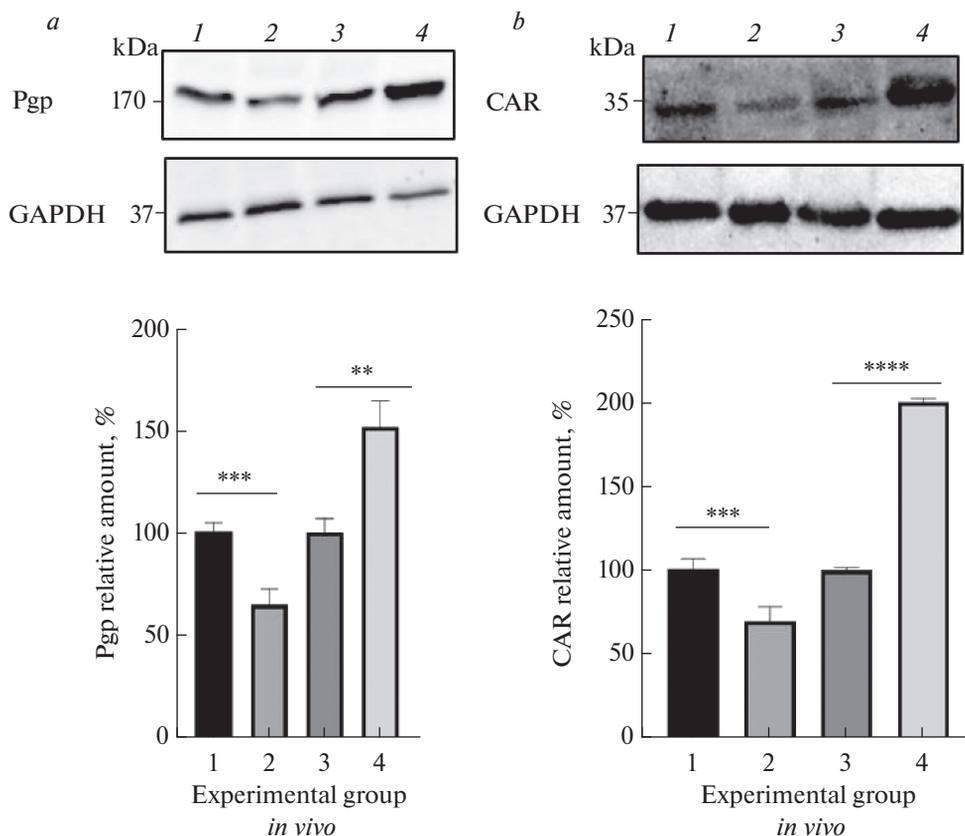
Количество PXR в тощей кишке кроликов оставалось на уровне контроля при изменении сывороточной концентрации тестостерона. AR детектировался в следовых количествах.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Pgr (ABCB1) — самый изученный белок-транспортер из суперсемейства ABC-транспортеров. Он играет важную роль в феномене резистентности опухолей к цитостатикам, удаляя их из клеток в межклеточное пространство, а также обеспечивает транспорт экзогенных и эндогенных веществ [3, 8]. Механизмы регуляции Pgr активно изучаются с целью разработки подходов к преодолению множественной лекарственной устойчивости опухолей, а также для улучшения доставки фармакологических активных веществ и прогнозирования развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий.

На данный момент выделяют следующие механизмы регуляции Pgr [23]: изменение экспрессии гена *MDR1* посредством влияния на его промотор; полиморфизм гена *MDR1*; увеличение дозы гена — амплификация участка генома, содержащего ген *MDR1*; стабилизация мРНК гена *MDR1*; влияние микроРНК на экспрессию Pgr; передача Pgr между клетками; изменение активности синтезированного белка-транспортера; влияние на гидролиз АТФ; изменение свойств цитоплазматических мембран. В ряде работ было показано, что тестостерон обладает способностью ингибировать активность Pgr без влияния на его количество. Согласно другим данным, тестостерон снижает и количество изучаемого белка-транспортера [9, 10, 14, 15].

В настоящем исследовании на клетках линии Сасо-2 при воздействии тестостерона в концентрациях 1 и 10 мкМ и инкубации 24 ч, а также на кроликах-самцах породы Шиншилла при внутримышечном введении тестостерона ундеcanoата в дозе 24 мг/кг массы в тощей кишке было подтверждено снижение количества Pgr. Для изучения механизмов влияния тестостерона на уровень Pgr было оценено ко-



**Рис. 4.** Относительное количество гликопротеина-P (Pgp) (a), конститутивного андростанового рецептора (CAR) (b) в тощей кишке кроликов-самцов при внутримышечном введении физиологического раствора (1), при внутримышечном введении тестостерона ундеcanoата в дозе 24 мг/кг массы (2), при проведении “ложной” операции (3), при орхиэктомии (4) на 21-е сутки ( $M \pm SD$ ,  $n = 5$ ). \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  по сравнению с соответствующим контролем (критерий Фишера).

личество AR, PXR и CAR. PXR и CAR являются членами суперсемейства ядерных рецепторов. Показано, что они стимулируют экспрессию генов, которые кодируют белки, участвующие в метаболизме и элиминации ксенобиотиков, таких как цитохромы P450, глюкуронозилтрансферазы, сульфотрансферазы и белки множественной лекарственной устойчивости [24, 25]. В опытах *in vitro* уровень CAR и PXR при воздействии тестостерона достоверно не изменялся, а AR практически не детектировался. Известно, что индукторы/ингибиторы CAR и PXR могут влиять на данные транскрипционные факторы без изменения их количества [26, 27]. То есть тестостерон теоретически может влиять на Pgp через ингибирование CAR и PXR. Для проверки данной гипотезы на клетках линии Saso-2 были выполнены эксперименты с использованием прямых ингибиторов CAR и PXR. В ходе исследования было выявлено, что ингибитор CAR – CINPA в концентрации 10 мкМ снижал количество Pgp, при этом комбинация CINPA и тестостерона также вызывала снижение уровня белка-транспортера, причем на том же уровне, что и изолированное применение ингибитора CAR. Ингибирование PXR не оказывало достоверного

влияния на уровень Pgr, это свидетельствует о том, что указанный рецептор не играет существенной роли в реализации влияния тестостерона на количество белка-транспортера.

В экспериментах *in vivo* снижение уровня тестостерона в сыворотке крови, вызванное орхиэктомией, сопровождалось повышением количества Pgr и CAR в тощей кишке. И наоборот, повышение концентрации тестостерона в сыворотке крови, вызванное внутримышечным введением тестостерона ундеcanoата в дозе 24 мг/кг вызывало снижение количества белка-транспортера и CAR.

Как и в культуре клеток Caco-2, в тощей кишке кроликов AR практически не детектировался, а концентрация PXR достоверно не изменялась в ходе эксперимента. Полученные данные *in vitro* и *in vivo* в совокупности свидетельствуют о том, что тестостерон оказывает влияние на уровень Pgr в энтероцитах, скорее всего, через CAR. Полученные результаты косвенно подтверждаются данными литературы. Так, на культурах клеток g2caq-3 и HepG2 показано, что андростанол, андростенон, тестостерон и андростендион (1–10 мкМ) подавляли активность CAR [28, 29]. В исследованиях на мышах выявлено, что орхиэктомия приводила к повышению синтеза CAR [29]. В то же время в исследовании на клетках линии hCMC/D3 установлено, что ингибирование не только CAR, но и PXR уменьшало экспрессию Pgr [30].

Отсутствие значения PXR в регуляции Pgr, выявленное в нашем исследовании, может быть связано с разными линиями клеток, использованными в экспериментах. Механизм влияния андрогенов на CAR окончательно не установлен. Предполагается, что андростанол и андростенон ингибируют CAR, способствуя высвобождению коактиватора из лиганд-связывающего домена рецептора [28]. Ограничением исследования является то, что роль CAR в регуляции Pgr *in vivo* была доказана лишь косвенно, по анализу уровня орфанного рецептора при изменении уровня тестостерона. Для подтверждения полученных данных требуются дальнейшие исследования, в частности эксперименты на животных с нокаутом CAR.

Таким образом, *in vitro* на клетках линии Caco-2 и *in vivo* на кроликах показано, что тестостерон снижает количество белка-транспортера Pgr, ингибируя конститутивный андростановый рецептор. Полученные результаты можно рассматривать как способ преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, обусловленной гиперэкспрессией данного белка-транспортера, а конститутивный андростановый рецептор – как возможную фармакологическую мишень для реализации этой цели.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ № 18-415-623001 и № 16-04-00320.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.В.Щ. и Е.Н.Я.), сбор данных (Ю.В.А., Н.М.П.), обработка данных (А.А.С.), написание и редактирование манускрипта (А.В.Щ., Е.Н.Я.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mollazadeh S, Sahebkar A, Hadizadeh F, Behravan J, Arabzadeh S (2018) Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. *Life Sci* 214: 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.048>
2. Chin KV, Liu B (1994) Regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene expression (Review). *In Vivo* 8(5): 835–841.
3. Gessner A, König J, Fromm MF (2019) Clinical Aspects of Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions. *Clin Pharmacol Ther* 105(6): 1386–1394. <https://doi.org/10.1002/cpt.1360>
4. Zhang J, Zhang M, Zhang J, Wang R (2020) Enhanced P-glycoprotein expression under high-altitude hypoxia contributes to increased phenytoin levels and reduced clearance in rats. *Eur J Pharm Sci* 1(153): 105490. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105490>
5. Shchulkin AV, Abalenikhina YV, Erokhina PD, Chernykh IV, Yakusheva EN (2021) The Role of P-Glycoprotein in Decreasing Cell Membranes Permeability during Oxidative Stress. *Biochemistry (Mosc)* 86(2): 197–206. <https://doi.org/10.1134/S0006297921020085>
6. Шулькин АВ, Якушева ЕН, Попова НМ (2013) Роль гликопротеина-Р в рациональной фармакотерапии в кардиологии. *Рационал фармакотер в кардиол* 9(6): 701–707. [Shchulkin AV, Yakusheva EN, Popova NM (2013) The role of glycoprotein-P in rational pharmacotherapy in cardiology. *Rational Pharmacother Cardiol* 9(6): 701–707. (In Russ)]. <https://doi.org/10.20996/1819-6446-2013-9-6-701-707>
7. Ерохина ПД, Абаленихина ЮВ, Шулькин АВ, Черных ИВ, Попова НМ, Слепнев АА, Якушева ЕН (2020) Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-Р *in vitro*. *Рос мед-биол вестн им акад ИП Павлова* 28 (2): 135–142 [Erokhina PD, Abalenikhina YuV, Shchulkin AV, Chernykh IV, Popova NM, Slepnev AA, Yakusheva EN (2020) A study of influence of progesterone on activity of glycoprotein-P *in vitro*. *IPPavlov Rus Med Biol Herald* 28(2): 135–142. (In Russ)]. <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2020282135-142>
8. Zhang H, Xu H, Ashby ChR, Assaraf YG, Chen Zh, Liu H (2021) Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp). *Med Res Rev* 41 (1): 525–555. <https://doi.org/10.1002/med.21739>
9. Dey S, Gunda S, Mitra AK (2004) Pharmacokinetics of erythromycin in rabbit corneas after single-dose infusion: role of P-glycoprotein as a barrier to *in vivo* ocular drug absorption. *J Pharmacol Exp Therap* 311 (1): 246–255. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.069583>
10. Van Kalken CK, Broxterman HJ, Pinedo HM, Feller N, Dekker H, Lankelma J, Giaccone G (1993) Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Br J Cancer* 67(2): 284–289. <https://doi.org/10.1038/bjc.1993.54>
11. Yang CP, DePinho SG, Greenberger LM, Arcenci RJ, Horwitz SB (1989) Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus *J Biol Chem* 264: 782–788.
12. Nakayama A, Eguchi O, Hatakeyama M, Saitoh H, Takada M (1999) Different absorption behaviors among steroid hormones due to possible interaction with P-glycoprotein in the rat small intestine. *Biol Pharm Bull* 22: 535–538. <https://doi.org/10.1248/bpb.22.535>
13. Suzuki T, Zhao YL, Nadai M, Naruhashi K, Shimizu A, Takagi K, Takagi K, Hasegawa T (2006) Gender-related differences in expression and function of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp2) in rats. *Life Sci* 79(5): 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.024>
14. Shchulkin AV, Yakusheva EN, Chernykh IV, Nikiforov AA (2017) The role of testosterone in the regulation of P-glycoprotein functioning. *Biol Bull* 44: 524–530. <https://doi.org/10.1134/S1062359017050168>
15. Shchulkin AV, Yakusheva EN, Chernykh IV, Nikiforov AA, Popova NM (2017) Effects of testosterone on the functional activity of P-glycoprotein. *Pharm Chem J* 51(9): 743–747. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1685-1>
16. Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS (1990) Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmac Res* 7 (9): 902–910. <https://doi.org/10.1023/a:1015937605100>
17. Fuchs I, Hafner-Blumenstiel V, Markert C, Burhenne J, Weiss J, Haefeli WE, Mikus G (2013) Effect of the CYP3A inhibitor ketoconazole on the PXR-mediated induction of CYP3A activity. *Eur J Clin Pharmacol* 69 (3): 507–513. <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1388-1>

18. *Cherian MT, Lin W, Wu J, Chen T* (2015) CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor. *Mol Pharmacol* 87 (5): 878–889. <https://doi.org/10.1124/mol.115.097782>
19. *Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, Lambert MH, Moore JT* (2002) Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 16 (5): 977–986. <https://doi.org/10.1210/mend.16.5.0828>
20. *Гацанова МВ, Черных ИВ, Шулькин АВ, Якушева ЕН, Попова НМ* (2016). Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р на самках кроликов породы шиншилла. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)* 3: 5–10. [*Gaczanoga MV, Chernykh IV, Shul'kin AV, Yakusheva EN, Popova NM* (2016). Is it possible to assess the affiliation of medicinal substances to glycoprotein-P substrates on female chinchilla rabbits? *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)* 3: 5–10. (In Russ)].
21. *Zhao C, Moon DG, Park JK* (2013) Effect of testosterone undecanoate on hematological profiles, blood lipid and viscosity and plasma testosterone level in castrated rabbits. *Can Urol Assoc J* 7(3–4): 221–225. <https://doi.org/10.5489/cuaj.507>
22. *Разина АВ, Фролова АИ, Сергеев МА* (2010) Оптимизация общей анестезии на кроликах. Актуальн вопр ветерин и биол 1: 32–35. [*Razina AV, Frolova AI, Sergeev MA* (2010) Optimizaciya obshhej anestezii na krolikah. *Akt Vopr Veterinari i Biol* 1: 32–35. (In Russ)].
23. *Якушева ЕН, Черных ИВ, Шулькин АВ, Попова НМ* (2014) Гликопротеин-Р: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности. Успехи физиол наук 45(4): 89–98. [*Yakusheva EN, Chernykh IV, Shul'kin AV, Popova NM* (2014) Glikoprotein-P: struktura, fiziologicheskaya rol' i molekulyarny'e mexanizmy' modulyacii funktsional'noj aktivnosti. *Uspehi fiziol nauk* 45(4): 89–98. (In Russ)]
24. *Buchman CD, Chai SC, Chen TA* (2018) Current structural perspective on PXR and CAR in drug metabolism. *Exp Opin Drug Metab Toxicol* 14(6): 635–647. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1476488>
25. *Burk O, Kuzikov M, Kronenberger T, Jeske J, Keminer O, Thasler WE, Schwab M, Wrenger C, Windshugel B* (2018) Identification of approved drugs as potent inhibitors of pregnane X receptor activation with differential receptor interaction profiles. *Arch Toxicol* 92(4): 1435–1451. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2165-4>
26. *Rigalli JP, Ruiz ML, Perdomo VG, Villanueva SS, Mottino AD, Catania VA* (2011) Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells. *Toxicology* 285(1-2): 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.015>
27. *Slosky LM, Thompson BJ, Sanchez-Covarrubias L, Zhang Y, Laracuenta ML, Vanderah TW, Ronaldson PT, Davis TP* (2013) Acetaminophen modulates P-glycoprotein functional expression at the blood-brain barrier by a constitutive androstane receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 84(5): 774–786. <https://doi.org/10.1124/mol.113.086298>
28. *Forman BM, Tzamelis I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RM, Moore DD* (1998) Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* 395: 612–615. <https://doi.org/10.1038/26996>
29. *Kawamoto T, Kakizaki S, Yoshinari K, Negishi M* (2000) Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse Cyp2b10 gene. *Mol Endocrinol* 14(11): 1897–1905. <https://doi.org/10.1210/mend.14.11.0547>
30. *Chan GNY, Hoque T, Cummins CL, Bendayan R* (2011) Regulation of P-glycoprotein by orphan nuclear receptors in human brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* 118 (2): 163–175. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07288.x>

### The Mechanism of the Influence of Testosterone on the Transport Protein P-Glycoprotein

A. A. Slepnev<sup>a</sup>, A. V. Shchulkin<sup>a</sup>, Yu. V. Abalenikhina<sup>a,\*</sup>, N. M. Popova<sup>a</sup>,  
I. V. Chernykh<sup>a</sup>, and E. N. Yakusheva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

\*e-mail: abalenikhina88@mail.ru

P-glycoprotein (Pgp) is an efflux membrane transport-protein that plays an important role in the protection of tumor cells from cytostatics and the drugs pharmacokinetics. Some studies have shown that testosterone can reduce the activity and expression of Pgp,

but the mechanisms of these changes remain unexplored. The aim of this study was to evaluate the role of androgenic, pregnane X and constitutive androstane receptors in this process in experiments *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* on Caco-2 cells testosterone (1 and 10  $\mu\text{M}$  for 24 h) reduced the amount of Pgp (western blot method) compared to the control. The pregnane X receptor (PXR) inhibitor ketoconazole (1 and 10  $\mu\text{M}$ , 24 h exposure) did not affect the amount of Pgp, while the constitutive androstane receptor (CAR) inhibitor CINPA at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  reduced the Pgp content. The combination of CINPA 10  $\mu\text{M}$  and testosterone 10  $\mu\text{M}$  also reduced the Pgp content, however, the amount of the transporter did not differ significantly from the values of the groups of isolated testosterone and CINPA. *In vivo* on male Chinchilla rabbits it was shown that single intramuscular injection of testosterone undecanoate at a dose of 24 mg/kg of body weight increased the level of testosterone in the blood serum on the 21-st day of the study compared to the control, and after orchiectomy, its content decreased on the 21st day. The relative amount of Pgp and CAR in the jejunum of rabbits decreased with the introduction of testosterone, and increased with orchiectomy. The amount of PXR and testosterone receptor in the jejunum of rabbits did not change significantly. Thus, *in vitro* and *in vivo* experiments have shown that testosterone reduces the amount of the Pgp transport protein by inhibiting the constitutive androstane receptor.

**Keywords:** P-glycoprotein, testosterone, Caco-2 cells, pregnan X receptor, constitutive androstane receptor, androgen receptor, western blot

**РОЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ В РАЗВИТИИ  
СЕКРЕТОРНОГО ФЕНОТИПА КЛЕТОК  
И КОГНИТИВНОЙ ДИСФУНКЦИИ У МЫШЕЙ ПРИ СТАРЕНИИ**

© 2022 г. Е. Д. Хилажева<sup>1</sup>, О. С. Белозор<sup>1</sup>, Ю. А. Панина<sup>1</sup>, Я. В. Горина<sup>1</sup>,  
А. И. Мосягина<sup>1</sup>, А. В. Васильев<sup>1</sup>, Н. А. Малиновская<sup>1</sup>, Ю. К. Комлева<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого  
Министерства здравоохранения РФ, Красноярск, Россия*

*\*E-mail: yuliakomleva@mail.ru*

Поступила в редакцию 05.07.2022 г.

После доработки 17.08.2022 г.

Принята к публикации 19.08.2022 г.

Старение организма характеризуется запуском многочисленных патофизиологических событий, которые включают воспаление, клеточную сенесценцию и развитие секреторного фенотипа, связанного со старением (SASP), измененную толерантность к глюкозе и инсулинорезистентность (ИР). Значительный вклад в развитие ИР головного мозга вносит нейровоспаление из-за активации мультипротеинового олигомерного комплекса – NLRP3 инфламмосомы. Целью исследования явилось изучение нарушения механизмов инсулиновой сигнализации и метаболического воспаления в головном мозге стареющих мышей линии C57BL/6. Мы обнаружили, что у стареющих мышей происходит повышение количества сенесцентных клеток в срезах головного мозга и сокультуре астроцитов и нейронов, а также увеличение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ PKR и IKK $\beta$  – компонентов метафламмосом. Другим компонентом метафламмосомы, экспрессия которого усиливалась в гиппокампе при старении, была IKK $\beta$ . В нашем исследовании было показано, что конститутивная активация IKK $\beta$  связана с клеточной сенесценцией и старением, а также с избыточной активацией NLRP3 инфламмосомы и увеличением продукции лактата у стареющих мышей. Изменения экспрессии инфламмосом в головном мозге находят отражение в изменении сложных форм поведения. В данном исследовании зафиксировано нарушение контекстуальной памяти у стареющих мышей, но не процесса приобретения и сигнальной памяти. Тем не менее, старение у мышей не приводило к изменению в экспрессии инсулиновых рецепторов, субстрата инсулиновых рецепторов 1 (IRS1phospho-S312). Это позволяет предположить, что при физиологическом старении, без признаков нейродегенерации, реактивного астроглиоза, еще не наблюдается нарушений инсулиновой сигнализации, но уже наблюдаются проявления метаболического воспаления. Таким образом, модуляция активности компонентов метафламмосом PKR и IKK $\beta$  может быть основой нового подхода управления механизмами метаболического воспаления и развития связанного со старением секреторного фенотипа клеток в головном мозге для улучшения когнитивных функций в пожилом и старческом возрасте.

*Ключевые слова:* инсулинорезистентность, метафламмосома, иммуносенесценция, инфламмосома, секреторный фенотип

DOI: 10.31857/S0869813922090072

Известно, что за последние десятилетия продолжительность жизни человека значительно увеличилась [1]. Старение — это сложный процесс, который происходит под влиянием генетических, эпигенетических факторов и факторов окружающей среды, а изменения в стареющем организме происходят на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях [2]. Некоторые из этих процессов, определяющих старение, включают воспаление, клеточную сенесценцию и развитие секреторного фенотипа, связанного со старением (SASP), измененную толерантность к глюкозе и инсулинорезистентность (ИР) в результате дисрегуляции чувствительности к питательным веществам и нарушениями межклеточной коммуникации [3]. Все эти патофизиологические процессы лежат в основе возрастных нейродегенеративных расстройств [4].

Иммунносенесценция и воспаление, связанное с самим старением, ассоциированы и со старением головного мозга. Эти процессы сопровождаются нарушением памяти и развитием когнитивной дисфункции, характерных для болезни Альцгеймера (БА) и болезни Паркинсона (БП) [1, 2]. В последнее время большое количество исследований было сосредоточено на изучении взаимосвязи ожирения, старения мозга и снижения когнитивных функций. Ранее было показано, что передача сигналов инсулина влияет на молекулярные каскады, которые лежат в основе функций гиппокампа, познания и памяти [5]. Наши предыдущие результаты показали, что значительный вклад в развитие ИР головного мозга вносит нейровоспаление из-за гиперпродукции провоспалительных цитокинов, активации астроглии и микроглии и нарушения процессов репаративного нейрогенеза [4, 6–8].

Воспаление — это иммунный ответ на множество экзогенных патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) и молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждениями (DAMP). Врожденная иммунная система, включая нейтрофилы, моноциты и макрофаги, обеспечивает первую линию защиты организма от патогенов [9]. PAMP и DAMP инициируют развитие воспалительного ответа через взаимодействие с Toll-подобными рецепторами (TLR) и рецепторами, подобными домену связывания и олигомеризации нуклеотидов (NOD) (NLR). Как член семейства NLR, инфламмосомы представляют собой группу больших цитозольных мультимерных белковых комплексов, которые обрабатывают и инициируют созревание IL-1 $\beta$  и IL-18 из молекул-предшественников. После созревания цитокины IL-1 $\beta$  и IL-18 предупреждают иммунную систему о потенциальной опасности и усиливают провоспалительную иммунную реакцию [10].

Из-за разнообразной природы стимулов воспаления NLRP3 многие исследования были направлены на понимание точных механизмов, которые приводят к активации NLRP3 инфламмосомы. Эти исследования показали, что инфламмосома NLRP3 в значительной степени регулируется клеточным метаболизмом [11, 12]. Растущее количество данных свидетельствует о том, что клеточный метаболизм является решающим регулятором клеточных функций, таких как метаболический контроль поляризации макрофагов и формирование иммунного ответа. Несмотря на предпологаемую защитную роль инфламмосомы NLRP3 и воспаления в целом, чрезмерная воспалительная активность была связана с развитием как острых, так и хронических патологий. Хроническим воспалением обычно считается длительное воспаление низкого уровня. Этот тип воспаления, наряду с метаболическим воспалением, называемым метафламмацией, способствует процессу старения [12, 13].

Факторы риска, которые были рассмотрены в связи со старением мозга, включают метаболические нарушения. Процесс старения мозга может сопровождаться нарушением метаболизма глюкозы или снижением поступления глюкозы в мозг. Более того, ИР головного мозга была связана с повышенным риском когнитивного дефицита и деменции [14]. Сборка мультимерной инфламмосомы происходит не

только при нейродегенеративных заболеваниях, но и при нарушениях обмена веществ [15, 16].

Термины “метаболические инфламмосомы” или “метафламмосомы” охватывают метаболические нарушения и вызываемое ими воспаление [17, 18]. Подтверждена экспрессия четырех основных компонентов комплекса метафламмосом в мозге человека. Он включает фосфорилированные формы ИКК $\beta$  (ингибитор бета-субъединицы киназы ядерного фактора ядра), IRS1 (субстрат 1-го рецептора инсулина), JNK (N-концевые киназы c-Jun) и PKR (двухцепочечная РНК-зависимая протеинкиназа) [19].

В связи с этим весьма актуальным является проведение фундаментальных исследований, направленных на изучение метаболических путей активации инфламмосом для регуляции и восстановления когнитивных функций, а также расширения регенеративного потенциала и пластичности головного мозга. Известно, что активация NLRP3 инфламмосомы может регулировать клеточный метаболизм [20].

Целью данного исследования явилось изучение нарушения механизмов инсулиновой сигнализации и метаболического воспаления (“метафламации”) в головном мозге у стареющих мышей линии C57Bl/6. Дальнейшее исследование этих вопросов поможет углубить наше понимание активации инфламмосом и заболеваний, связанных с нарушением экспрессии инфламмосом, и будет способствовать выявлению потенциальных терапевтических мишеней метаболических путей и метаболитов для предотвращения или лечения воспалительных заболеваний.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовались мыши линии C57BL/6, самцы в возрасте 4–5 мес., массой 25–30 г ( $n = 12$ ); мыши линии C57BL/6, самцы в возрасте 14–15 мес., массой 25–30 г ( $n = 15$ ). Часть экспериментов выполнена *in vitro* с получением нейрофер от мышей исследуемых групп.

Грызунов содержали в индивидуально-вентилируемых клетках по 5–6 особей с соблюдением температуры 21–22°C со свободным доступом к воде и гранулярному корму и регулярном световом цикле 12 ч день/12 ч ночь. Все манипуляции выполнялись во время светлой фазы дня. В ходе эксперимента были предприняты все усилия для сведения к минимуму страданий животных и сокращения их числа согласно принципам работы с животными (Принцип 3 “R”). Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и проводились в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского Парламента и Совета Европейского союза (2010/63/ЕС). На все эксперименты было получено разрешение биоэтической комиссии Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

## 1. ПОВЕДЕНЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

### *Тест “Условно-рефлекторного замирания” (Fear conditioning)*

Оборудование для проведения тестирования представляло собой акриловую квадратную камеру с электрифицированным решетчатым полом для подачи электрического сигнала (безусловный раздражитель (unconditioned stimulus (US)) во время белого шума – условного раздражителя (conditioned stimulus (CS)). Данная камера помещена в большой звуконепроницаемый бокс (Ugo Basil, Италия) [21].

Данный тест проводится согласно описанной методике в течение трех дней [22].

*Создание условий для запоминания (conditioning day)*

В первый день создаются условия для запоминания и обучения в данном тесте, проявляющиеся возрастающим временем замирания. Для реализации таких условий для замирания в течение первого дня животное помещали в новую камеру. Свободно передвигающаяся мышь исследовала камеру в течение 120 с. После этого в качестве условного раздражителя (CS) подавали звуковой сигнал (белый шум, 55 дБ) в течение 30 с, а в качестве безусловного стимула (US) в течение последних 2 с белого шума подавали ток 0.3 мА. Подачу стимулов CS–US повторяли три раза, чтобы сформировать у животного условный рефлекс страха. Предъявление такой комбинации стимулов происходила на 120-, 240- и 360-й с после начала теста. Анализ полученных результатов проводился за каждый выделенный промежуток времени (с 0-й по 120-ю, со 120-й по 240-ю, с 240-й по 360-ю и с 360-й по 480-ю с) для отслеживания динамики приобретения ассоциации условного раздражителя с безусловным стимулом.

*Контекстуальная обусловленность страха (Context day)*

Контекстуальный тест (второй день тестирования) проводили через 24 ч после первого теста, когда создавали условия для замирания в той же камере в течение 300 с в отсутствие предоставления каких-либо стимулов (без подачи белого шума (CS) и электрического сигнала 0.3 мА (US)).

*Условное (вызванное стимулом) выражение страха (Cued day)*

В третий день тестирования (сигнальный тест) испытательная камера отличалась от камеры, использованной в первый и второй дни по цвету стен, структуре пола (без решетки), и освещенностью 30 люкс, обеспечивая новый контекст. Тест состоял из 180-секундного периода исследования мышью новой среды, чтобы оценить неспецифический контекстуальный страх, за которым следовал условный стимул на 180-й с (белый шум (CS) без последующей подачи электрического тока (US)), чтобы оценить приобретенный страх. Процент времени замирания в каждом временном отрезке был определен как показатель памяти страха, поскольку замирание как наиболее распространенный элемент в поведении, вызванный сильной болью или страхом, зачастую используется для количественной характеристики в тесте FC [21–23]. Весь процесс тестирования фиксировался с помощью системы видеонализа за животными ANY MAZE (Behavior Tracking Software, Stelting, США).

## 2. ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

**Выделение и культивирование нейрофер.** Животных декапитировали и производили забор головного мозга. Извлеченный мозг помещали в ледяной раствор 2%-ный раствор глюкозы в PBS (ПанЭко, Россия), после чего выделяли гиппокамп и измельчали его скальпелем на кусочки размером около 1 мм<sup>3</sup>. Полученные кусочки ткани переносили пастеровской пипеткой в центрифужную пробирку, содержащую свежий раствор 2%-ной глюкозы в PBS и оставляли на 1 мин. После осаждения кусочков ткани удаляли супернатант. В пробирку вносили 3 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell, США) и проводили механическую диссоциацию ткани стерильной серологической пипеткой до получения однородной суспензии клеток, после чего центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. После центрифугирования удаляли супернатант и добавляли 3 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. Полученную клеточную суспензию переносили в культуральные флаконы T-75 см<sup>2</sup> с 25 мл среды NeuroCult NS-A Proliferation. Культивирование осу-

ществлялось в условиях инкубатора при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C. Через 48 ч после выделения наблюдали образование нейросфер. Пассажи и смену среды осуществляли каждые 4–5 дней.

**Дифференцировка нейросфер.** На 3-м пассаже собирали из флакона среду, нейросферы осаждали центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. Супернатант сливали, нейросферы ресуспендировали в культуральной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 20% FBS (HyClone, США), 0.58 мг/мл глутамин (ПанЭко, Россия), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Клетки засеивали в культуральные флаконы T-75 см<sup>2</sup>. Через 5–7 дней наблюдали дифференцировку нейросфер в сокультуру астроцитов и нейронов. Через 10 дней дифференцированную культуру клеток пересаживали в 24-луночные или 96-луночные культуральные планшеты для дальнейшего изучения.

### 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОСЕНЕСЦЕНЦИИ

Набор для обнаружения сенесценции предназначен для гистохимического обнаружения специфического маркера старения при различных значениях pH в культивируемых клетках и срезах тканей. Сенесцентные клетки демонстрируют увеличение размера, связанную со старением экспрессию активности β-галактозидазы (SA-β-Gal) и измененные паттерны экспрессии генов. Набор для обнаружения старения предназначен для гистохимического определения активности SA-β-Gal в культивируемых клетках и срезах тканей, что является известной характеристикой стареющих клеток. SA-β-Gal присутствует только в сенесцентных клетках и не обнаруживается в предсенесцентных, клетках в состоянии покоя или некротизированных клетках.

Исследование сенесценции проводили с помощью набора Senescence Detection Kit (K320, BioVision, США) согласно протоколу изготовителя. Клетки фиксировали с помощью Fixative Solution в течение 15 мин, однократно промывали PBS, после чего добавляли к клеткам Staining Solution Mix и инкубировали при 37°C в течение ночи. По завершении инкубации наблюдали появление голубой окраски клеток. Интенсивность изменения окраски определяли спектрофотометрически при длине волны 620 нм с помощью планшетного спектрофотометра Anthos (Biochrom, Великобритания). В случае окрашивания срезов (нефиксированных в PFA) окраску проводили по аналогичному принципу с изучением голубой окраски на микроскопе Olympus BX45. Далее снимки обрабатывали в программе ImageJ и оценивали как минимум 5 случайно выбранных снимков.

### 4. ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ОКРАШИВАНИЕ

Для регистрации целевых молекул – маркеров использовали метод двойного непрямого иммуноцитохимического окрашивания согласно протоколу фирмы-изготовителя антител. Были использованы первичные антитела к ИКК (ab178870, Abcam, Великобритания), PKR (ab32506, Abcam, Великобритания), IR (ab137747, Abcam, Великобритания); IRS1 (ab66154, Abcam, Великобритания). Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1 : 300. Время инкубации с первичными антителами составляло 18 ч при 4°C. Вторичные антитела, меченные Alexa 555 (ab150078, Abcam, Великобритания), использовали в разведении 1 : 500, время инкубации составляло 2 ч при 37°C.

Микроскопию клеток осуществляли на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad, США). Выполняли подсчет относительного количества клеток, экспрессирующих антиген, а также интенсивность флуоресценции исследуемых маркеров с помощью программного обеспечения ImageJ.

## 5. ИММУНОГИСТОХИМИЯ И КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

После глубокой анестезии проводили транскардиальную перфузию 4%-ным параформальдегидом (PFA) с 0.1 М фосфатно-солевым буфером (Sigma, США). Мозг удаляли и постфиксировали в 4%-ном PFA при 4°C в течение ночи, а затем погружали на 48 ч при 4°C в 20%-ный раствор сахарозы, растворенной в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.4), содержащем 0.01% азид натрия (Sigma, США). Срезы толщиной 50 мкм делали с помощью вибротома (Thermo Scientific) в сагиттальном направлении с использованием стереотаксического атласа для определения локализации гиппокампа. Свободно плавающие срезы мозга блокировали в PBS, содержащем 10% нормальной козьей сыворотки (Sigma), 2% альбумина бычьей сыворотки (BSA) (Sigma), 1% Triton X-100 (Sigma) и 0.1% азид натрия (Sigma) в течение 1 ч при комнатной температуре.

Использовали следующие антитела: анти-GFAP (Abcam, ab4674, Великобритания) 1 : 1000, анти-NeuN (Merk, ABN90) 1 : 1000, анти-IRS1 (phosphor S312) (Abcam, ab66154, Великобритания), анти-IL18 (sc6177-4, Santa Cruz Biotechnology), анти-NLRP3 (Abcam, ab23073-96, Великобритания), анти-ИКК $\beta$  (ab178870, Abcam, Великобритания), PKR (ab32506, Abcam, Великобритания). На следующий день после инкубации с антителами срезы промывали в PBS, а затем инкубировали с Alexa-конъюгированными вторичными антителами 1 : 1000 (Invitrogen) в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывания срезы монтировали на предметные стекла, наносили водную монтажную среду Fluoromount (Sigma) и предметные стекла закрывали покровным стеклом. Изображения были получены с 60-кратным объективом на конфокальном флуоресцентном микроскопе Olympus FV 10i и обрабатывались с помощью программного обеспечения Olympus FluoView (Ver.4.0a) и программы ImageJ. Репрезентативные изображения гиппокампа в соответствии со стереотаксическим атласом Paxinos и Franklin [24] были взяты по крайней мере из двух срезов от семи мышей на группу.

## 6. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистический анализ полученных результатов включал методы описательной статистики с использованием программы GraphPad Prism7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, США). Критерий Колмогорова–Смирнова использовали для оценки нормальности распределения. При несоблюдении условий нормальности распределения сравнение двух групп осуществляли с помощью непараметрического  $U$  критерия Манна–Уитни. Для оценки влияния двух факторов применяли двухфакторный ANOVA (two-way ANOVA): применялся двухфакторный дисперсионный анализ независимых выборок. Последующее попарное сравнение групп проводили с помощью post-hoc Sidak's теста множественных сравнений.

Уровень значимости при проверке гипотез принимали  $p \leq 0.05$ . Все результаты представлены в виде  $M \pm SE$ , где  $M$  – среднее значение,  $SE$  – ошибка среднего,  $p$  – уровень значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Старение характеризуется нарушением контекстуальной памяти у мышей*

У мышей разного возраста изучали ассоциативную память в тесте “Fear Conditioning” (FC), в котором мыши учат связывать нейтральный стимул (условный раздражитель – белый шум), с авersiveм (электрический ток) и при этом демонстрировать условный ответ (в виде реакции замирания). После повторяющихся в первый день обучения пар стимулов животные начинают ассоциировать неприятный стимул с нейтральным. Для оценки ассоциативной памяти в тесте “Fear Con-

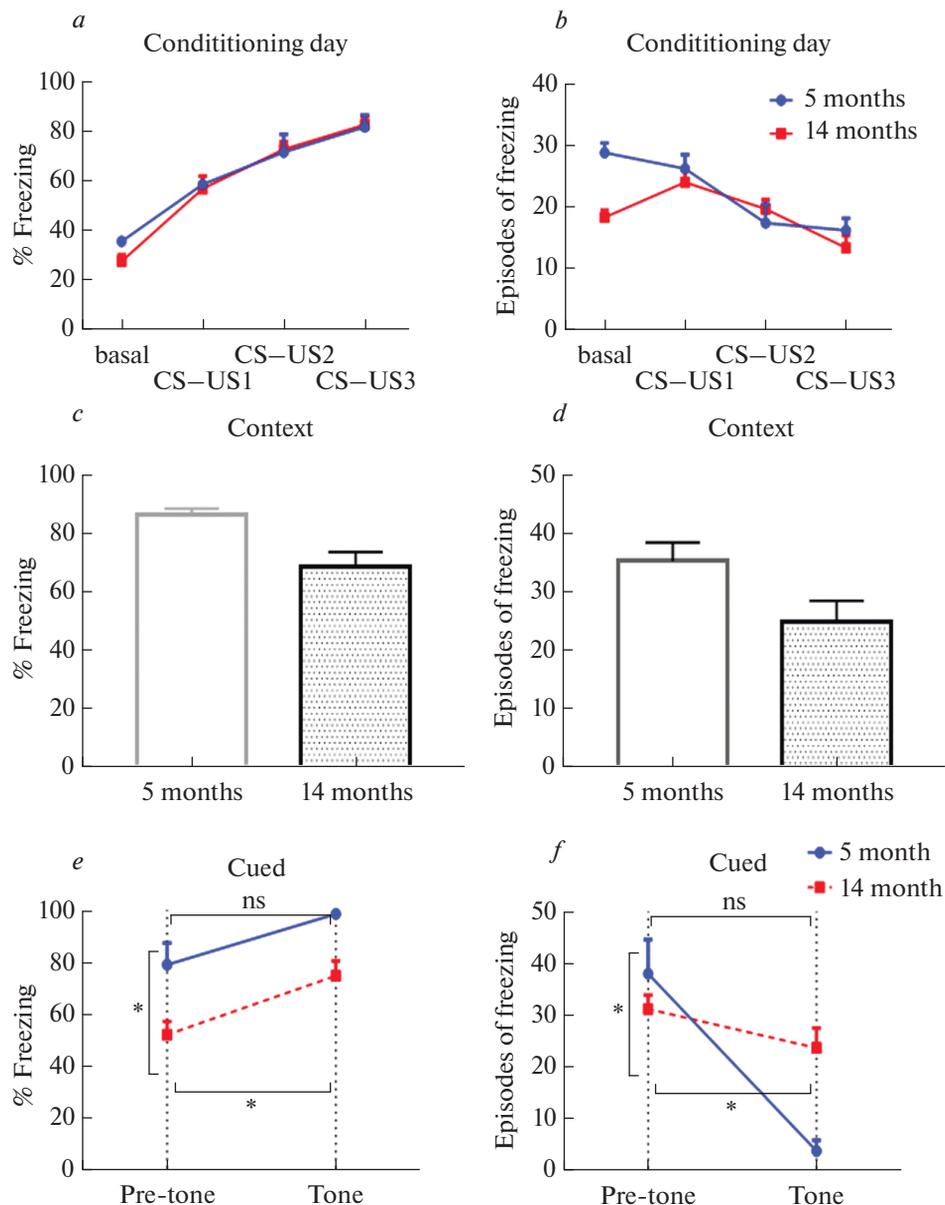
ditioning” в первый день изучали приобретение памяти (кривая обучения) с последующим анализом контекстуальной и сигнальной памяти в ранний период (на первый–второй день после создания условий для замирания). Оценивали процент времени замирания в каждый день тестирования и число эпизодов замирания. В первый день анализ проводили в различные временные интервалы для построения кривой обучения. Во второй день анализ проводили за весь период времени, а в третий – до и после подачи условного стимула [25].

В первый день тестирования была исследована динамика запоминания для построения кривой обучения. Для этого сначала измерили базальный уровень замирания до предъявления мышам пары согласованных стимулов (базальный уровень). Далее предъявляли в равные промежутки времени (120 с) пару стимулов (CS–US) с трехкратным повторением. Процент времени замирания фиксировали в каждый интервал. Также в каждый временной промежуток, включая базальный, оценивали число эпизодов замирания. В день создания условий для замирания не было выявлено статистически значимого влияния взаимодействия двух факторов ( $F(3,76) = 0.4, p = 0.8$ ) (рис. 1а). При последующем множественном сравнении для анализа динамики кривой обучения не было выявлено различий в проценте замирания на базальном уровне (до стимулов) у мышей исследуемых групп. Также не отмечено статистически достоверной разницы при сравнении групп между собой в разные интервалы времени. При анализе эпизодов замирания также не было найдено статистически значимого влияния двух факторов ( $F(3,76) = 2.5, p = 0.06$ ) (рис. 1б). Таким образом, не выявлено нарушений на этапе приобретения памяти у группы мышей в возрасте 5 и 14 месяцев.

При оценке извлечения памяти в контексте (контекстуальной) оценили процент замирания у двух групп. Отмечено статистически значимое различие между группами зрелых мышей (5 месяцев) и стареющими мышами (14 месяцев). Зрелые мыши замирают дольше ( $86.4 \pm 2.0\%$ ) по сравнению с стареющими ( $68.6 \pm 4.9\%$ ) ( $p = 0.02$ , критерий Манна–Уитни). Аналогичные данные получены при анализе эпизодов замирания: число эпизодов замирания в группе зрелых мышей  $35.2 \pm 3.2$ , в группе стареющих статистически значимо меньше –  $24.8 \pm 3.6$  ( $p < 0.05$ ) (рис. 1с, д).

На третий день тестирования в абсолютно новых для мышей условиях фиксировался процент времени замирания – базальный и после сигнального извлечения памяти посредством подачи белого шума. Отметим статистически значимое влияние фактора возраста мышей ( $F(1,38) = 14.7, p < 0.001$ ), а также фактора самого белого шума ( $F(1,38) = 10.2, p < 0.01$ ), (двухфакторный дисперсионный анализ Two-way ANOVA) (рис. 1е, ф).

С помощью множественного анализа зафиксировали статистически значимые различия в базальном уровне замирания (при помещении в новую среду): у зрелых мышей ( $79.1 \pm 8.3\%$ ) и у стареющей группы ( $52.2 \pm 5.1\%$ ) ( $p = 0.04$ , Sidak’s критерий). При сравнении процента замирания в динамике (от базального и после предъявления звукового тона) в группе зрелых мышей не наблюдали достоверных отличий ( $p = 0.4$ , Sidak’s критерий), что вероятно, вместе с высоким процентом времени замирания до предъявления шума может являться показателем избыточной тревожности, нежели отсутствия ассоциативной связи между шумом и потенциальной возможностью воздействия электрического тока. В группе стареющих мышей эти параметры статистически значимо отличаются ( $p = 0.02$ , Sidak’s критерий). Подтверждает эти данные и число эпизодов замирания в группе зрелых мышей: до предъявления условного стимула число эпизодов замирания было высоким ( $38.0 \pm 6.6$ ), после предъявления стимула происходило снижение числа эпизодов замирания ( $3.7 \pm 2.1$ ) ( $p < 0.001$ , Sidak’s критерий), что соответствует при этом высокому времени замирания (т.е. иными словами, животные проводят все время в неподвижной позиции).



**Рис. 1.** Изучение ассоциативной памяти в тесте “Fear Conditioning”.

(a) – процент времени замирания в первый день создания условий для запоминания в тесте “Условно-рефлекторного замирания”. Pre-tone – до подачи белого шума, CS–US1 – первая пара стимулов, CS–US2 – вторая пара стимулов, CS–US3 – третья пара стимулов. (b) – число эпизодов замирания в первый день создания условий для запоминания в тесте “Условно-рефлекторного замирания”. (c) – процент времени замирания в контекстный день. (d) – число эпизодов замирания в контекстный день. (e) – процент времени замирания в сигнальный день. Pre-tone – до подачи белого шума, Tone – подача белого шума. (f) – число эпизодов замирания в сигнальный день. 5 months – мыши C57Bl/6 в возрасте 5 мес.; 14 months – в возрасте 12–14 мес.

Таким образом, у стареющих мышей зафиксировано нарушение контекстуальной памяти (во второй день тестирования), но не процесса приобретения и сигнальной памяти. Ранее в исследованиях было показано, что синаптическая пластичность миндалевидного тела играет важную роль в приобретении и экспрессии условного замирания, а гиппокамп в свою очередь необходим для контекстуального запоминания [42].

*Старение сопровождается увеличением числа сенесцентных клеток и повышением экспрессии маркеров воспаления*

Ограниченная способность к репликации является определяющей характеристикой большинства нормальных клеток и достигает кульминации при старении. Известно, что сенесцентные стареющие клетки не стимулируются к делению сывороткой или пассажем в культуре, а сам процесс старения индуцирует специфический профиль клеточного цикла. Старение сопровождается увеличенным размером клеток, экспрессией рН-зависимой активности  $\beta$ -галактозидазы, а также измененным характером экспрессии генов.

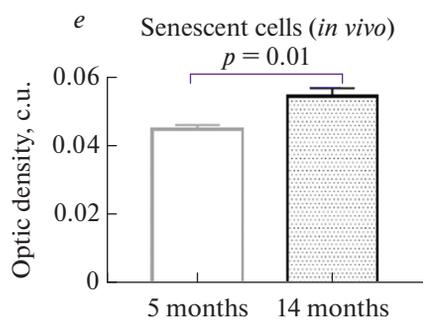
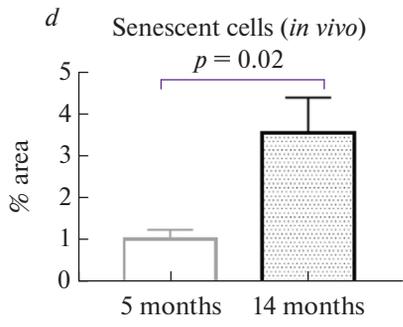
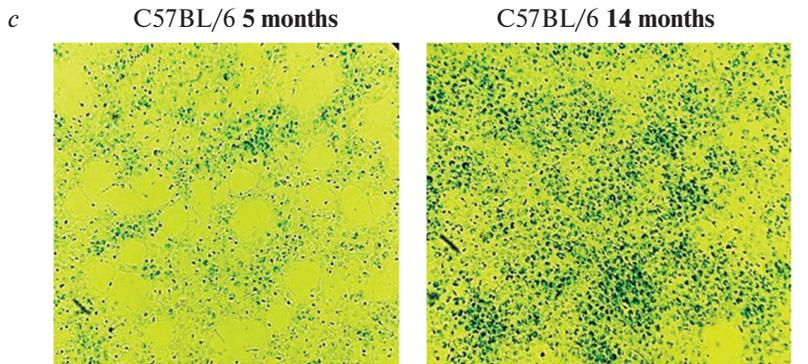
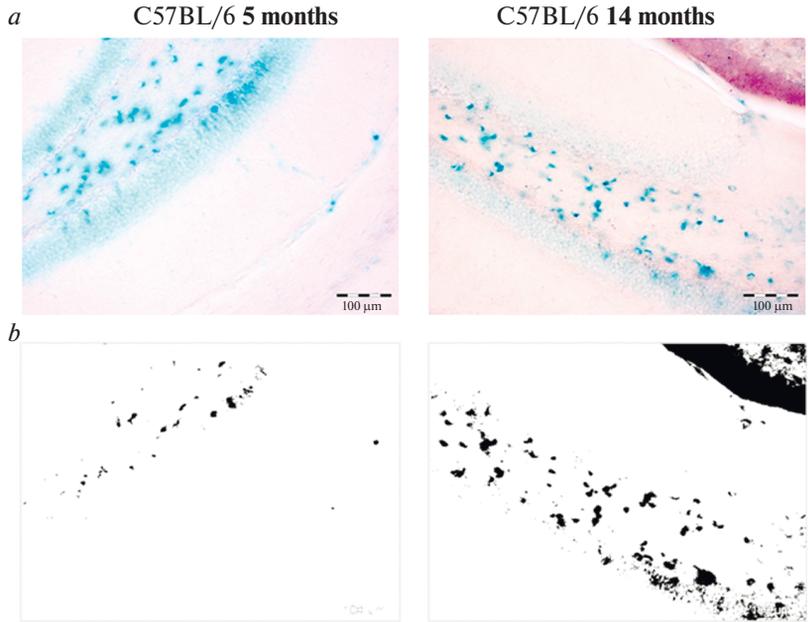
Мы изучили активность  $\beta$ -галактозидазы в клетках гиппокампа на срезах и в сокультуре клеток с использованием SA- $\beta$ -Gal набора. Хромогенное окрашивание клеток подтвердило индукцию SA- $\beta$ -Gal в гиппокампе. Клетки в гиппокампе стареющих мышей демонстрируют более высокий уровень маркеров старения ( $3.5 \pm 0.8\%$  площади сенесцентных клеток) по сравнению с группой зрелых животных ( $1 \pm 0.2\%$  площади сенесцентных клеток) ( $p = 0.02$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 2а, b, d).

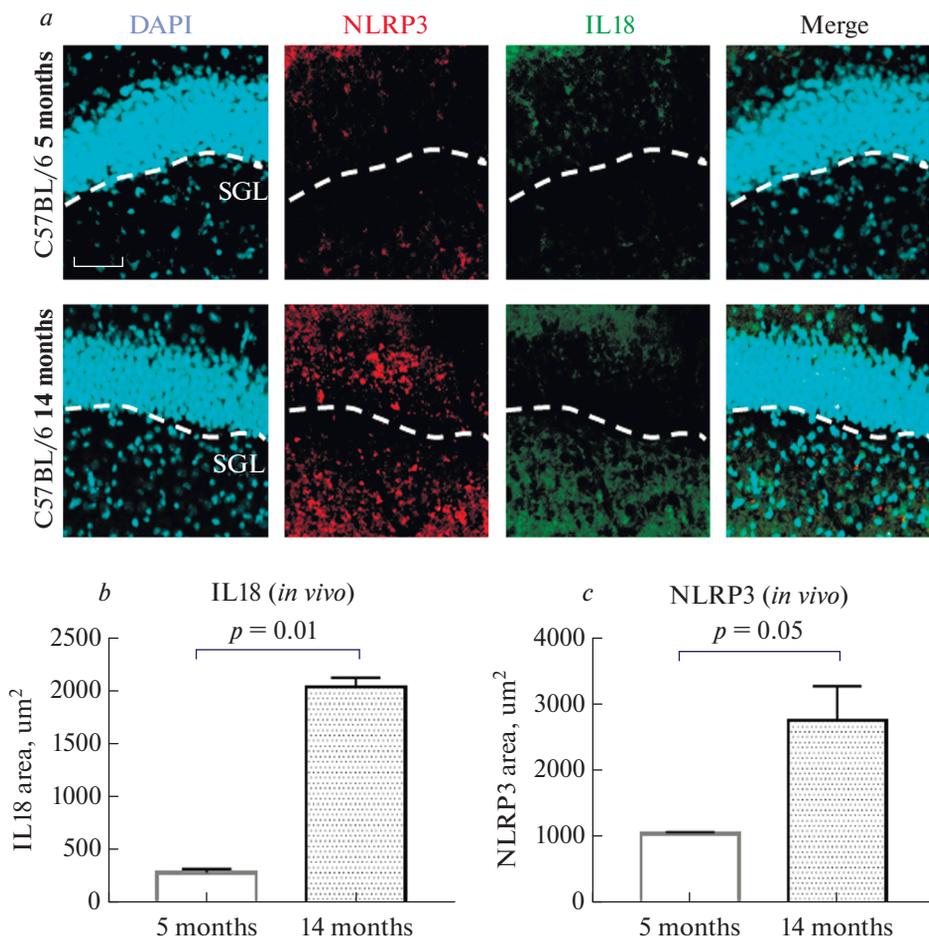
Подтверждают эти результаты данные, полученные в сокультуре нейронов и астроцитов от животных разных групп. При изучении сенесценции спектрофотометрически было зарегистрировано статистически значимое увеличение  $\beta$ -галактозидазной активности, свойственной стареющим клеткам, в сокультуре клеток, выделенной от 12-месячных животных ( $0.055 \pm 0.002$  оптическая плотность), по сравнению с молодыми животными ( $0.045 \pm 0.0013$ ,  $p = 0.01$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 2с, е).

Таким образом, активность  $\beta$ -галактозидазы в клетках стареющих животных была выше, что связано с увеличением сенесцентных клеток. Известно, что провоспалительный интерлейкин IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и IL6 являются основными составляющими SASP [4]. Поэтому далее было проведено исследование изменения экспрессии мультибелкового комплекса инфламماسомы NLRP3, которая участвует в созревании и секреции IL-1 $\beta$  и IL-18. В клетках гиппокампа животных в возрасте 14 мес. площадь экспрессии IL-18 была значимо выше ( $2038.0 \pm 89.2$  мкм<sup>2</sup>) по сравнению с группой мышей в возрасте 5 мес. ( $283.1 \pm 35.5$  мкм<sup>2</sup>) ( $p < 0.01$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 3а, b). Аналогичные результаты получены при анализе снимков с экспрессией инфламماسомы NLRP3: у стареющих мышей –  $2789 \pm 531$  мкм<sup>2</sup> против  $1063 \pm 19$  мкм<sup>2</sup> у зрелых ( $p < 0.05$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 3а, с).

**Рис. 2.** Изучение сенесценции *in vivo* и *in vitro*.

(a) – репрезентативные снимки окраски SA- $\beta$ -gal *in vivo*. Голубое окрашивание идентифицирует сенесцентные клетки. (b) – изображение SA- $\beta$ -gal + клеток, полученное с помощью программы Image. (c) – репрезентативные снимки окраски SA- $\beta$ -gal *in vitro*. (d) – количественный анализ SA- $\beta$ -gal + клеток, представленный в виде занимаемой площади на срезах. (e) – количественный анализ SA- $\beta$ -gal + клеток, представленный в виде оптической площади в у.е. в сокультуре клеток. 5 months – C57Bl/6 мыши в возрасте 5 мес., 14 months – C57Bl/6 мыши в возрасте 14 мес.





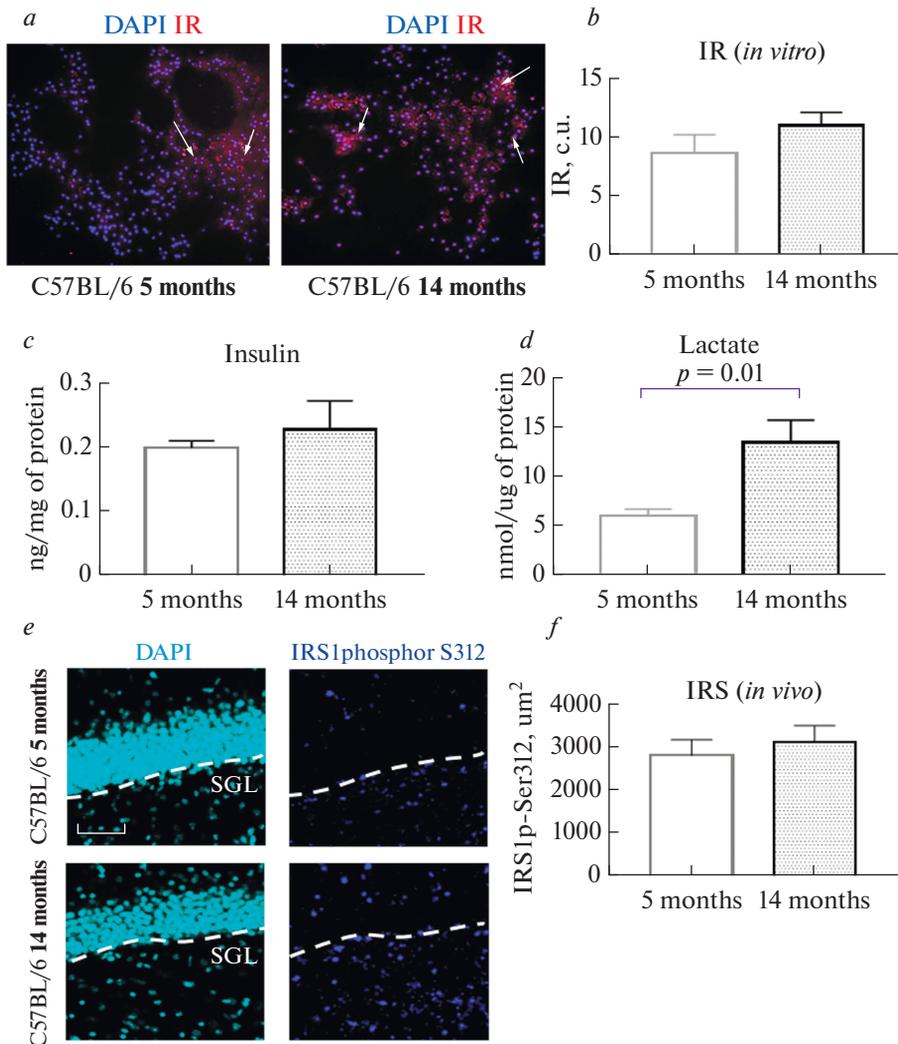
**Рис. 3.** Экспрессия маркеров воспаления при старении.

(a) – тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах мышей в возрасте 5 и 14 мес.: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (голубой), во второй колонке – экспрессия NLRP3 (красный), в третьей колонке – экспрессия IL1 $\beta$  (зеленый), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм. (b) – площадь экспрессии IL1 $\beta$ , мкм<sup>2</sup>. (c) – площадь экспрессии NLRP3, мкм<sup>2</sup>. 5 months – C57Bl/6 мыши в возрасте 5 мес., 14 months – 14 мес.

Таким образом, при старении было отмечено увеличение сенесцентных клеток, которые характеризуются секреторным фенотипом, сопровождающимся увеличением экспрессии NLRP3 инфламмасом и IL-18.

*Старение приводит к увеличению уровня лактата, но не к изменению экспрессии маркеров инсулинорезистентности*

Далее в сокультуре астроцитов и нейронов исследовали экспрессию инсулиновых рецепторов (IR). Также была отмечена тенденция к увеличению экспрессии инсулиновых рецепторов клетками, выделенными от стареющих животных ( $11.0 \pm 1.1$  у.е.) по сравнению с 5-месячными мышами ( $8.6 \pm 1.5$  у.е.), однако, статистически зна-



**Рис. 4.** Экспрессия маркеров инсулиновой сигнализации.

(a) – репрезентативные снимки экспрессии IR (инсулиновых рецепторов) в сокультуре астроцитов и нейронов, выделенных от молодых (5 мес.) и стареющих (14 мес.) мышей. Ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), IR (красный). (b) – количественный анализ экспрессии IR в сокультуре клеток. (c) – определение уровня инсулина в гомогенатах гиппокампа. (d) – определение уровня лактата в гомогенатах гиппокампа. (e) – двойное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах мышей в возрасте 5 и 14 мес.: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), во второй колонке – экспрессия IRS1phospho-S312 (синий). SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100 мкм. (f) – площадь экспрессии IRS1phospho-S312, мкм<sup>2</sup>. 5 months – C57Bl/6 мыши в возрасте 5 мес., 14 months – 14 мес.

чимых различий в уровне экспрессии IR в экспериментальных группах выявлено не было ( $p = 0.2$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 4a, b). Не было выявлено и статистически значимых различий в уровне инсулина в гомогенатах гиппокампа мышей исследуемых групп – в группе стареющих мышей ( $0.23 \pm 0.05$  нг/мг белка), в группе зрелых животных ( $0.2 \pm 0.01$  нг/мг белка) ( $p > 0.9$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 4c).

Далее была определена концентрация продукта метаболизма глюкозы – лактата в гиппокампе методом иммуноферментного анализа. Лактат, входящий в активированные синапсы, играет метаболическую роль, в соответствии с высокими потребностями в энергии мембранных и клеточных процессов, необходимых для долговременной синаптической пластичности и памяти [26]. В исследовании был определен высокий уровень лактата у стареющих животных ( $13.4 \pm 2.6$  нмоль/мкг белка) по сравнению с мышами в возрасте 5 месяцев ( $5.9 \pm 0.7$ ) ( $p = 0.01$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 4d).

При иммуногистохимическом исследовании площади экспрессии патологически фосфорилированного IRS1 не было выявлено статистически значимых различий в группе стареющих ( $3118 \pm 39$  мкм<sup>2</sup>) и зрелых мышей ( $2809 \pm 37$  мкм<sup>2</sup>) ( $p = 0.4$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 4e, f). Таким образом, у стареющих мышей не выявлено признаков формирования инсулинорезистентности, но найдено увеличение уровня лактата в гиппокампе.

*При старении у мышей наблюдается увеличение экспрессии  
фосфорилированных протеиназ метафламмасом*

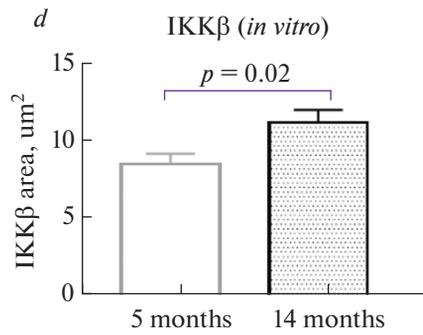
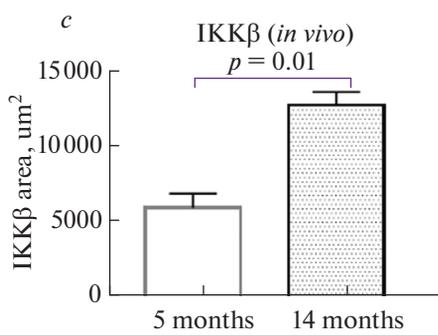
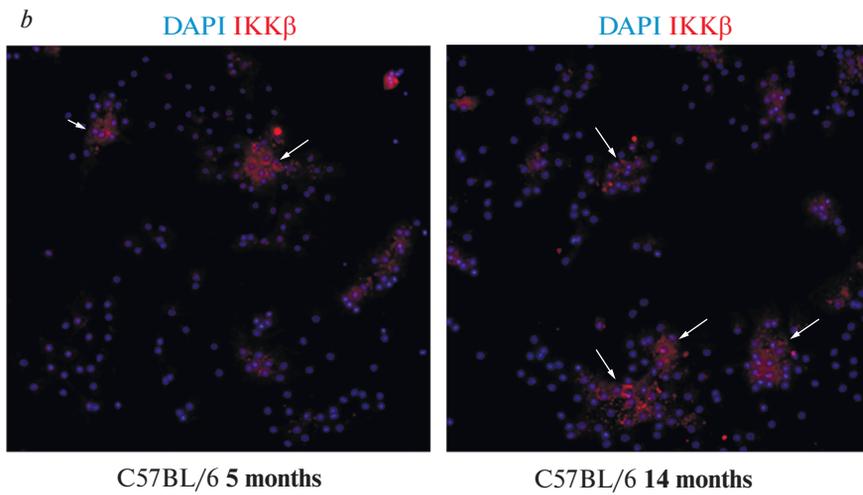
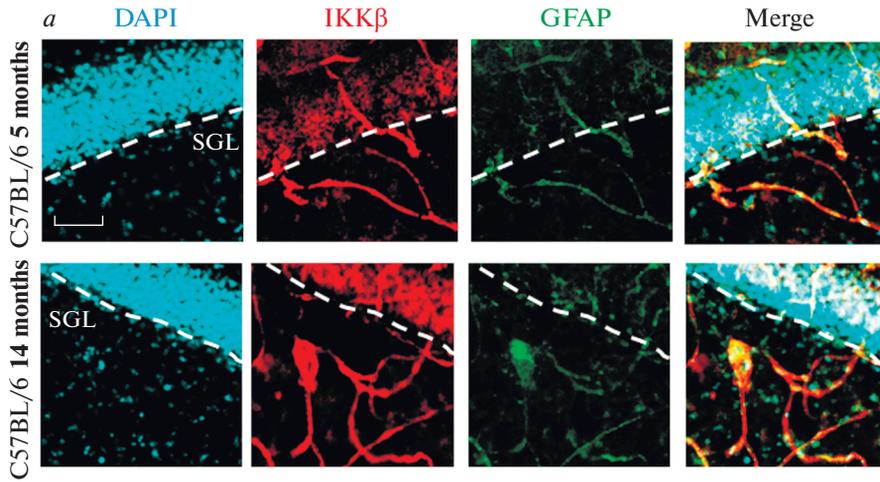
Поскольку известно, что процесс старения мозга может сопровождаться нарушением метаболизма глюкозы или снижением поступления глюкозы в мозг, центральная инсулинорезистентность связана с повышенным риском когнитивного дефицита [5]. Как уже было описано, термин “метафламмоса” был введен для описания клеточной сигнальной реакции, вызванной DAMP, за которой следует ответ метаболического пути и выброс цитокинов [18]. Мы исследовали экспрессию основных компонентов комплекса метафламмасом в головном мозге мышей разного возраста.

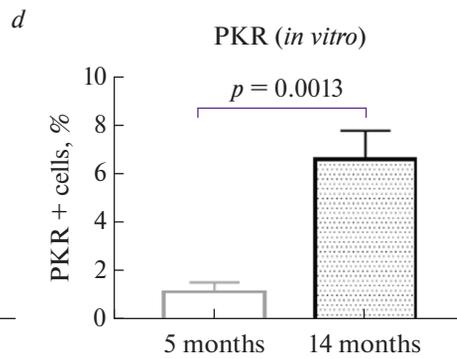
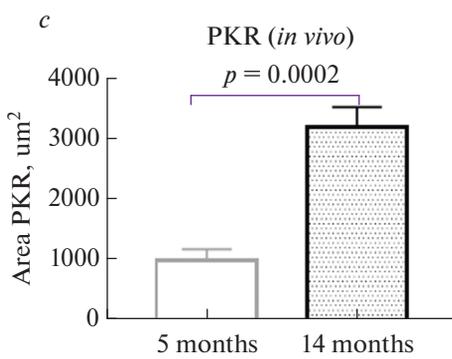
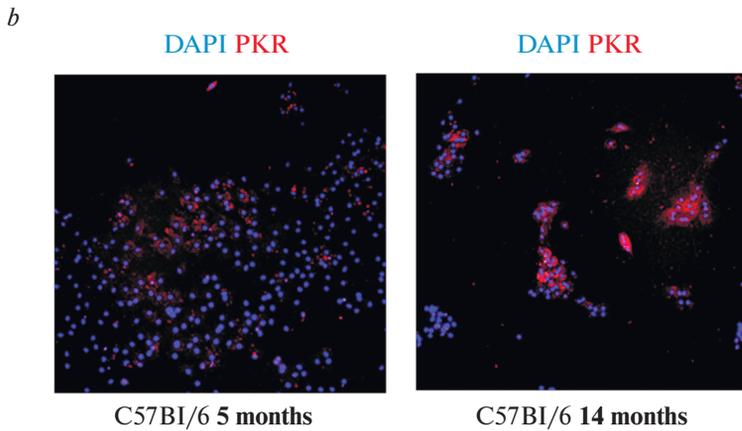
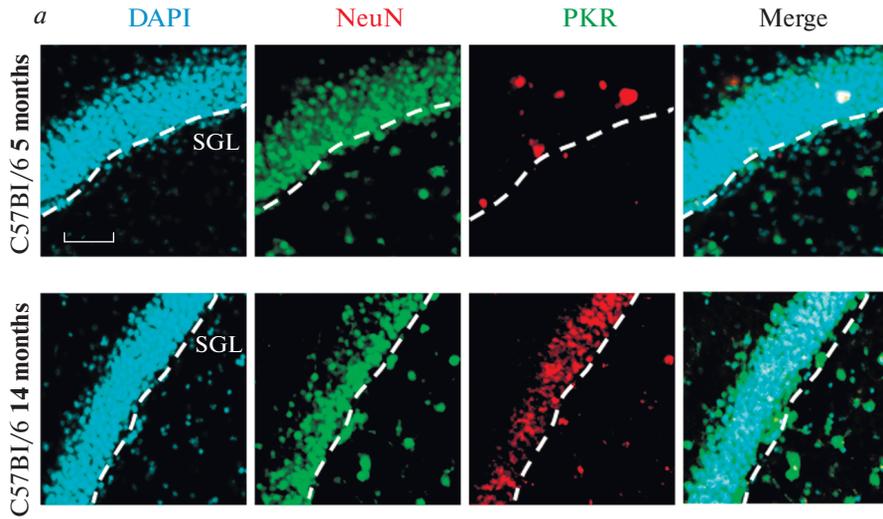
Было выявлено статистически значимое увеличение экспрессии фосфорилированной формы ИККβ *in vivo* и *in vitro*. Площадь экспрессии ИККβ в группе стареющих мышей составила  $12780 \pm 890$  мкм<sup>2</sup> по сравнению с животными зрелой группы –  $5920 \pm 943.9$  мкм<sup>2</sup> ( $p < 0.01$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 5a, c). Установлено также, что в сокультуре клеток, выделенных от стареющих животных, уровень экспрессии киназы ИККβ выше ( $11.2 \pm 0.8$  у.е.), чем в клетках, полученных от молодых животных ( $8.5 \pm 0.7$  у.е.) ( $p = 0.02$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 5b, d).

Площадь экспрессии PKR в гиппокампе стареющих животных была выше ( $3206.9 \pm 335.2$  мкм<sup>2</sup>) по сравнению с 5-месячными мышами ( $984.2 \pm 189.2$  мкм<sup>2</sup>) ( $p < 0.001$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 6a, c). Также было выявлено, что в культуре клеток, выделенных от стареющих животных, количество клеток, экспрессирующих PKR в 5 раз выше ( $6.6 \pm 1.2\%$ ), чем в культуре, выделенной от молодых животных ( $1.1 \pm 0.4\%$ ) ( $p < 0.01$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 6b, d). Таким образом, в группе стареющих мышей наблюдали увеличение экспрессии фосфорилированных протеиназ метафламмасом.

**Рис. 5.** Экспрессия фосфорилированной формы ИККβ *in vivo* и *in vitro*.

(a) – тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах мышей в возрасте 5 и 14 мес.: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), во второй колонке – экспрессия ИККβ (красный), в третьей колонке – экспрессия GFAP (зеленый), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100 мкм. (b) – репрезентативные снимки экспрессии ИККβ в сокультуре астроцитов и нейронов, выделенных от молодых (5 мес.) и стареющих (14 мес.) мышей. Ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), ИККβ (красный). (c) – площадь экспрессии ИККβ в срезах головного мозга, мкм<sup>2</sup>. (d) – количественный анализ экспрессии ИККβ в сокультуре клеток. 5 months – C57Bl/6 мыши в возрасте 5 мес., 14 months – 14 мес.





←  
**Рис. 6.** Экспрессия PKR *in vivo* и *in vitro*.

(a) – тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах мышей в возрасте 5 и 14 мес.: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия PKR (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100 мкм. (b) – репрезентативные снимки экспрессии PKR в сокультуре астроцитов и нейронов, выделенных от молодых (5 мес.) и стареющих (14 мес.) мышей. Ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), PKR (красный). (c) – площадь экспрессии PKR в срезах головного мозга, мкм<sup>2</sup>. (d) – количественный анализ экспрессии PKR в сокультуре клеток. 5 months – C57Bl/6 мыши в возрасте 5 мес., 14 months – 14 мес.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку старение является основным риском развития возрастных заболеваний, в последнее время очень активно развиваются направления в науке, ориентированные на профилактику и терапию ассоциированных с возрастом состояний. Эта тема, безусловно, очень популярна не только в медицинском сообществе, но и в обществе в целом [27].

### *Воспаление, ассоциированное со старением, сопровождается активацией инфламмасомы и продукцией провоспалительных цитокинов*

Клеточное старение характеризуется неспособностью клеток к пролиферации. При этом старение характеризуется тремя основными фазами: фаза индукции (характеризуется укорочением теломер, повреждением ДНК, депривацией факторов роста); вторая фаза – реакция на повреждение ДНК; и фаза 3 – остановка роста (молекулы сигнальной трансдукции p53, p21 запускают остановку роста) [28].

Мы показали, что у стареющих мышей происходит увеличение количества сенесцентных клеток *in vivo* и сокультуре астроцитов и нейронов. Сенесцентные клетки характеризуются необратимой остановкой роста в ответ на различные стрессы, и одной из отличительных черт сенесцентных клеток является секреция набора факторов, называемого секреторным фенотипом, ассоциированным со старением (SASP), состоящего из провоспалительных медиаторов, факторов роста, металлопротеиназ и других компонентов [29].

Хроническое воспаление, отличительный признак старения, также вызывает клеточную сенесценцию и способствует старению тканей [4, 30]. Процесс старения и патогенез воспалительных состояний, связанных со старением, приводят к увеличению различных провоспалительных цитокинов, метаболитов, агрегатов и химически активных веществ. Было доказано, что все они приводят к активации NLRP3 инфламмасомы с помощью различных механизмов, что способствует дальнейшему развитию воспаления и прогрессированию заболевания [4, 20].

Одним из наиболее важных факторов старения мозга является чрезвычайно высокая потребность нейронов в энергии для поддержания их работы и сохранения умственных способностей [31]. С возрастом наблюдается усиление системного воспаления, метаболических изменений и периферического иммунного старения. Из-за реципрокных взаимодействий между нервной и иммунной системами развивается хроническое асептическое воспаление в центральной нервной системе, называемое “нейровоспалительным” старением [32].

Ранее было показано, что нейровоспаление в гиппокампе играет важную роль в развитии тревожных и когнитивных расстройств, связанных с забыванием, но лежащий в их основе механизм до сих пор полностью не выяснен. Nod-подобный рецепторный белок (NLRP) 3 инфламмасома, который контролирует выработку провоспалительных цитокинов, широко вовлечен в заболевания, связанные с ней-

ровоспалением [6, 33]. В настоящем исследовании мы показываем, что NLRP3 инфламмоса значительно активируется в гиппокампе при старении.

*Процесс старения ассоциирован с усиленной активацией компонентов метафламмосы*

Метаболические нарушения, включая ожирение и диабет 2-го типа, как известно, связаны с хроническим воспалением и являются очевидными факторами риска болезни Альцгеймера — патологического старения [33], но также, возможно, играют роль при физиологическом старении. Недавние данные, касающиеся ожирения и диабета, позволяют предположить, что метаболическая инфламмоса (“метафламмоса”) опосредует хроническое воспаление [34, 35].

Также в своем исследовании мы убедительно продемонстрировали повышение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ PKR и IKK $\beta$  — компонентов метафламмосы при старении мышей. Двухцепочечная РНК-зависимая протеинкиназа (PKR) является центральным компонентом метафламмосы [33]. Недавно было показано, что двухцепочечная РНК-зависимая протеинкиназа (PKR) является основным регулятором активации инфламмосы. У стареющих мышей PKR активировалась в гиппокампе. Эти результаты показывают, что воспалительный путь PKR/NLRP3 гиппокампа играет важную роль в развитии сенесцентного фенотипа клеток. Более того, ранее в исследованиях была продемонстрирована защитная роль нокаута гена PKR. У мышей дикого типа (WT) и PKR $-/-$  после индукции ожирения диетой с высоким содержанием жиров наблюдали значительное повышение уровня активированных белков метафламмосы головного мозга у подвергшихся воздействию мышей WT, но изменения не были значительными у мышей PKR $-/-$  [33]. Также в исследованиях было ранее подтверждено, что РНК-активированная протеинкиназа запускает активацию канонической инфламмосы NLRP3 и каспазы-1, что приводило к процессингу и секреции про-IL-1 $\beta$ . PKR активировала инфламмосу посредством образования активных форм кислорода и MAP-киназ ERK1/2, JNK и p38 [36].

Другим компонентом метафламмосы, экспрессия которого усиливалась в гиппокампе при старении, была IKK $\beta$ . Активированный комплекс IKK фосфорилирует белки I $\kappa$ B, что приводит к их последующей деградации. В результате димер NF- $\kappa$ B, секвестрированный в цитоплазме, высвобождается и перемещается в ядро, чтобы активировать специфический механизм транскрипции. Нормальная активация NF- $\kappa$ B необходима для поддержания многих физиологических функций, тогда как его аномальная или хроническая активация связана со многими воспалительными и возрастными заболеваниями. NF- $\kappa$ B также играет ключевую роль в клеточной сенесценции и процессе старения. Биоинформатические исследования показали, что NF- $\kappa$ B является фактором транскрипции, наиболее связанным со старением млекопитающих. Кроме того, конститутивная активация NF- $\kappa$ B вызывает сенесценцию и старение млекопитающих, обеспечивая экспрессию факторов SASP, включая провоспалительные цитокины и хемокины (например, p16INK4a, p21CIP1, IL-6, IL-1 $\alpha$  и TNF $\alpha$ ) [30, 37]. В нашем исследовании было показано, что конститутивная активация IKK $\beta$  связана с клеточной сенесценцией и старением, а также избыточной активацией NLRP3 инфламмосы.

*Физиологическое старение сопровождается увеличением продукции лактата*

Известно, что активация NLRP3 инфламмосы важна для активации врожденных иммунных ответов, но неправильная и чрезмерная активация может вызвать воспалительное заболевание [8, 38]. Ранее было показано, что гликолиз — метаболический путь, который превращает глюкозу в пируват, необходим для активации

NLRP3 инфламмосомы в макрофагах. Также ранее было показано, что снижение ферментации лактата путем ингибирования лактатдегидрогеназы снижает активацию каспазы-1 и созревание IL-1 $\beta$  в ответ на различные агонисты воспаления NLRP3, такие как нигерицин, АТФ, кристаллы мононатрия урата или квасцы, это указывает на то, что ферментация лактата необходима для активации инфламмосомы NLRP3. Ингибирование лактатдегидрогеназы с помощью GSK2837808A снижало выработку лактата и активность NLRP3 инфламмосомы, фосфорилированной протеинкиназы R (PKR), но не уменьшало общий триггер воспаления NLRP3, отток калия или продукцию активных форм кислорода [39, 40].

Наши результаты показывают, что увеличение содержания лактата у стареющих мышей сопровождается активацией NLRP3 инфламмосом. Некоторые авторы рассматривают перепрограммирование метаболизма пирувата в митохондриях и цитоплазме как новую стратегию лечения NLRP3-инфламмосом-ассоциированных заболеваний [40].

#### *Старение ассоциировано с нарушением контекстуальной памяти*

Изменения экспрессии инфламмосом в головном мозге находят отражение в изменении сложных форм поведения. Ранее нами было показано, что блокирование NLRP3 приводит к неожиданным последствиям нарушений эмоциональной сферы и памяти: развитие тревожного поведения, нарушений процессов формирования и извлечения памяти, что, безусловно, находит свое отражение на клеточном и молекулярном уровне: нарушение ранних этапов нейрогенеза, формирования астроцитов и синаптической передачи [6, 7, 38].

Старение связано со снижением эпизодической памяти и изменениями функций мозга, связанных с памятью [41]. В данном исследовании зафиксировано нарушение контекстуальной памяти у стареющих мышей, но не процесса приобретения и сигнальной памяти. Ранее было показано, что фронтотемпоральная миндалина головного мозга имеет важное значение в приобретении и реализации условного замиранья, а гиппокамп, в свою очередь, необходим для контекстуального запоминания [42, 43].

Предыдущие результаты показывают, что старение влияет на способность использовать контекст для модулирования усвоенных ответов на угрозу, возможно, из-за изменений в структурах мозга, которые обеспечивают контекстно-зависимое поведение и преимущественно уязвимы во время старения [44]. К таким структурам относится в первую очередь зубчатая извилина гиппокампа [45].

В остальном нарушений памяти не было выявлено. Кроме того, старение у мышей не приводило к изменению в экспрессии инсулиновых рецепторов, субстрата инсулиновых рецепторов 1 (IRS1phospho-S312). Это позволяет предположить, что при физиологическом старении, без признаков нейродегенерации, реактивного астроглиоза, еще не наблюдается нарушений инсулиновой сигнализации, но уже наблюдаются проявления метаболического воспаления.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, модуляция активности компонентов метафламмосом PKR и IKK $\beta$  может быть новой патогенетически обоснованной стратегией управления механизмами метаболического воспаления и развития связанного со старением секреторного фенотипа клеток в головном мозге. Данная стратегия может быть использована для улучшения когнитивных функций в пожилом и старческом возрасте.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук, МД-2368.2022.3.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента (Ю.К.К., Е.Д.Х.), проведение эксперимента (Ю.К.К., Е.Д.Х., О.С.Б., Ю.А.П., Я.В.Г., А.И.М., А.В.В.), обработка данных, подготовка графических материалов (Ю.К.К., Е.Д.Х., О.С.Б., Н.А.М.), написание и редактирование манускрипта (Ю.К.К., Е.Д.Х.)

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена на приборной базе Центра коллективного пользования Молекулярные и клеточные технологии, ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения РФ, Красноярск, Россия.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Costantini E, D'Angelo C, Reale M* (2018) The Role of Immunosenescence in Neurodegenerative Diseases. *Mediat Inflamm* 1–12.  
<https://doi.org/10.1155/2018/6039171>
2. *Khan SS, Singer BD, Vaughan DE* (2017) Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell* 16(4): 624–633.  
<https://doi.org/10.1111/ace1.12601>
3. *de Souto Barreto P, Guyonnet S, Ader I, Andrieu S, Casteilla L, Davezac N, Rolland Y* (2020). The INSPIRE research initiative: a program for GeroScience and healthy aging research going from animal models to humans and the healthcare system. *J Frailty Aging* 1–8.  
<https://doi.org/10.14283/jfa.2020.18>
4. *Komleva Y, Chernykh A, Lopatina O, Gorina Y, Lokteva I, Salmina A, Gollasch M* (2021) Inflamm-Aging and Brain Insulin Resistance: New Insights and Role of Life-style Strategies on Cognitive and Social Determinants in Aging and Neurodegeneration. *Front Neurosci* 14: 618395.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.618395>
5. *Spinelli M, Fusco S, Grassi C* (2019) Brain Insulin Resistance and Hippocampal Plasticity: Mechanisms and Biomarkers of Cognitive Decline. *Front Neurosci* 13: 788.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00788>
6. *Komleva YK, Lopatina OL, Gorina YV, Shuvaev AN, Chernykh AI, Potapenko IV, Salmina AB* (2021) NLRP3 deficiency-induced hippocampal dysfunction and anxiety-like behavior in mice. *Brain Res* 1752: 147220.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147220>
7. *Komleva YK, Potapenko IV, Lopatina OL, Gorina YV, Chernykh AI, Khilazheva ED, Shuvaev AN* (2021) NLRP3 Inflammasome Blocking as a Potential Treatment of Central Insulin Resistance in Early-Stage Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 22(21): 11588.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222111588>
8. *Komleva YK, Lopatina OL, Gorina YV, Chernykh AI, Shuvaev AN, Salmina AB* (2018) Early changes in hippocampal neurogenesis induced by soluble Ab1-42 oligomers. *Biomed Chem* 64(4): 326–333.  
<https://doi.org/10.18097/PBMC20186404326>
9. *Heneka MT, McManus RM, Latz E* (2018) Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nature Rev Neurosci* 19(10): 610–621.  
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0055-7>
10. *Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA* (2018) Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front Immunol* 9: 586.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00586>

11. Barra NG, Henriksbo BD, Anhe FF, Schertzer JD (2020). The NLRP3 inflammasome regulates adipose tissue metabolism. *Biochem J* 477(6): 1089–1107.  
<https://doi.org/10.1042/BCJ20190472>
12. Meyers AK, Zhu X (2020) The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammaging. *Cells* 9(8): 1808.  
<https://doi.org/10.3390/cells9081808>
13. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G (2006) Inflammaging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Ann NY Acad Sci* 908(1): 244–254.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
14. Litwiniuk A, Bik W, Kalisz M, Baranowska-Bik A (2021) Inflammasome NLRP3 Potentially Links Obesity-Associated Low-Grade Systemic Inflammation and Insulin Resistance with Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 22(11): 5603.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22115603>
15. Kelley N, Jeltama D, Duan Y, He Y (2019) The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci* 20(13): 3328.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
16. Zahid A, Li B, Kombe AJK, Jin T, Tao J (2019) Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol* 10: 2538.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02538>
17. Kanbay M, Yerlikaya A, Sag AA, Ortiz A, Kuwabara M, Covic A, Afssar B (2019) A journey from microenvironment to macroenvironment: the role of metaflammation and epigenetic changes in cardiorenal disease. *Clin Kidney J* 12(6): 861–870.  
<https://doi.org/10.1093/ckj/sfz106>
18. Kuryłowicz A, Koźniewski K (2020) Anti-Inflammatory Strategies Targeting Metaflammation in Type 2 Diabetes. *Molecules* 25(9): 2224.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25092224>
19. Taga M, Minett T, Classey J, Matthews FE, Brayne C, Ince PG, MRC CFAS (2017) Metaflammasome components in the human brain: a role in dementia with Alzheimer's pathology?: Metaflammasome Proteins in Alzheimer's Disease. *Brain Pathol* 27(3): 266–275.  
<https://doi.org/10.1111/bpa.12388>
20. Gritsenko A, Green JP, Brough D, Lopez-Castejon G (2020) Mechanisms of NLRP3 priming in inflammaging and age related diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 55: 15–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.08.003>
21. Горина ЯВ, Комлева ЮК, Лопатина ОЛ, Волкова ВВ, Черных АИ, Шабалова АА, Салмина АБ (2017) Батарея тестов для поведенческого фенотипирования стареющих животных в эксперименте. Успехи геронтолог 1: 49–55. [Gorina YV, Komleva YK, Lopatina OL, Volkova VV, Chernykh AI, Shabalova AA, Salmina AB (2017) Battery of tests for behavioral phenotyping of aging animals in experiment. *Advances Gerontol* 1: 49–55. (In Russ)].
22. Shoji H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T (2014) Contextual and Cued Fear Conditioning Test Using a Video Analyzing System in Mice. *J Visual Exp* 85.  
<https://doi.org/10.3791/50871>
23. Morimura N, Yasuda H, Yamaguchi K, Katayama K, Hatayama M, Tomioka NH, Aruga J (2017) Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in *Lrnf2/SALM1*-deficient mice. *Nature Communicat* 8: 15800.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms15800>
24. Paxinos G, Franklin KBJ (2004) The mouse brain in stereotaxic coordinates (Compact 2nd ed.). Amsterdam. Boston. Elsevier Acad Press.
25. Pai CS, Sharma PK, Huang HT, Loganathan S, Lin H, Hsu Y-L, Liu IY (2018) The Activating Transcription Factor 3 (*Atf3*) Homozygous Knockout Mice Exhibit Enhanced Conditioned Fear and Down Regulation of Hippocampal GELSOLIN. *Front Mol Neurosci* 11: 37.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00037>
26. Zhang M, Cheng X, Dang R, Zhang W, Zhang J, Yao Z (2018) Lactate Deficit in an Alzheimer Disease Mouse Model: The Relationship With Neuronal Damage. *J Neuropathol Exp Neurol* 77(12): 1163–1176.  
<https://doi.org/10.1093/jnen/nly102>
27. Scapagnini G, Caruso C, Spera G (2016) Preventive Medicine and Healthy Longevity: Basis for Sustainable Anti-Aging Strategies. In: N Scuderi & BA Toth (Eds), *International Textbook of Aesthetic Surgery*. Berlin. Heidelberg. Springer.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-662-46599-8\\_82](https://doi.org/10.1007/978-3-662-46599-8_82)
28. Martínez-Zamudio RI, Dewald HK, Vasilopoulos T, Gittens-Williams L, Fitzgerald-Bocarsly P, Herbig U (2021) Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase reveals the abundance of senescent CD8<sup>+</sup> T cells in aging humans. *Aging Cell* 20(5).  
<https://doi.org/10.1111/acel.13344>
29. Papadopoulos D, Magliozzi R, Mitsikostas DD, Gorgoulis VG, Nicholas RS (2020) Aging, Cellular Senescence, and Progressive Multiple Sclerosis. *Front Cell Neurosci* 14: 178.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00178>

30. Zhang L, Zhao J, Mu X, McGowan SJ, Angelini L, O'Kelly RD, Robbins PD (2021) Novel small molecule inhibition of IKK/NF- $\kappa$ B activation reduces markers of senescence and improves healthspan in mouse models of aging. *Aging Cell* 20(12).  
<https://doi.org/10.1111/accel.13486>
31. de Tredern E, Rabah Y, Pasquer L, Minatchy J, Plaçais PY, Preat T (2021) Glial glucose fuels the neuronal pentose phosphate pathway for long-term memory. *Cell Reports* 36(8): 109620.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109620>
32. Diniz BS, Vieira EM, Mendes-Silva AP, Bowie CR, Butters MA, Fischer CE on behalf of the PACI-MD Study Group (2021) Mild cognitive impairment and major depressive disorder are associated with molecular senescence abnormalities in older adults. *Alzheimer's & Dementia: Translational Res Clin Intervent* 7(1).  
<https://doi.org/10.1002/trc2.12129>
33. Taga M, Mouton-Liger F, Sadoune M, Gourmaud S, Norman J, Tible M, Hugon J (2018) PKR modulates abnormal brain signaling in experimental obesity. *PLOS One* 13(5): e0196983.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196983>
34. Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang H-Y, Ahima RS, Nathan DM (2018) Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nature Rev Neurol* 14(3): 168–181.  
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.185>
35. Hugon J, Mouton-Liger F, Dumurgier J, Paquet C (2017) PKR involvement in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res & Therapy* 9(1): 83.  
<https://doi.org/10.1186/s13195-017-0308-0>
36. Stunnenberg M, Hamme JL, Trimp M, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH (2021) Abortive HIV-1 RNA induces pro-IL-1 $\beta$  maturation via protein kinase PKR and inflammasome activation in humans. *Eur J Immunol* 51(10): 2464–2477.  
<https://doi.org/10.1002/eji.202149275>
37. Dresselhaus EC, Meffert MK (2019) Cellular Specificity of NF- $\kappa$ B Function in the Nervous System. *Front Immunol* 10: 1043.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01043>
38. Komleva YK, Lopatina OL, Gorina YV, Chernykh AI, Trufanova LV, Vais EF, Salmina AB (2022) Expression of NLRP3 Inflammasomes in Neurogenic Niche Contributes to the Effect of Spatial Learning in Physiological Conditions but Not in Alzheimer's Type Neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol* 42(5): 1355–1371.  
<https://doi.org/10.1007/s10571-020-01021-y>
39. Li Q, Liu S, Zhu X, Mi W, Maoying Q, Wang J, Wang Y (2019) Hippocampal PKR/NLRP1 Inflammasome Pathway Is Required for the Depression-Like Behaviors in Rats with Neuropathic Pain. *Neuroscience* 412: 16–28.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.025>
40. Lin H-C, Chen Y-J, Wei Y-H, Lin H-A, Chen C-C, Liu T-F, Chen L-C (2021) Lactic Acid Fermentation Is Required for NLRP3 Inflammasome Activation. *Front Immunol* 12: 630380.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630380>
41. Subramaniapillai S, Rajagopal S, Elshiekh A, Pasvanis S, Ankudowich E, Rajah MN (2019) Sex Differences in the Neural Correlates of Spatial Context Memory Decline in Healthy Aging. *J Cogn Neurosci* 31(12): 1895–1916.  
[https://doi.org/10.1162/jocn\\_a\\_01455](https://doi.org/10.1162/jocn_a_01455)
42. Bouton ME, Maren S, McNally GP (2021) Behavioral and neurobiological mechanisms of pavlovian and instrumental extinction learning. *Physiol Rev* 101(2): 611–681.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2020>
43. Tran T, Tobin KE, Block SH, Puliyadi V, Gallagher M, Bakker A (2021) Effect of aging differs for memory of object identity and object position within a spatial context. *Learning & Memory* 28(7): 239–247.  
<https://doi.org/10.1101/lm.053181.120>
44. Battaglia S, Garofalo S, di Pellegrino G (2018) Context-dependent extinction of threat memories: influences of healthy aging. *Sci Rep* 8(1): 12592.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31000-9>
45. Bernier BE, Lacagnina AF, Ayoub A, Shue F, Zemelman BV, Krasne FB, Drew MR (2017) Dentate Gyrus Contributes to Retrieval as well as Encoding: Evidence from Context Fear Conditioning, Recall, and Extinction. *J Neurosci* 37(26): 6359–6371.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3029-16.2017>

### The Role of Metaflammation in the Development of Senescence-Associated Secretory Phenotype and Cognitive Dysfunction in Aged Mice

E. D. Khilazheva<sup>a</sup>, O. S. Belozor<sup>a</sup>, Yu. A. Panina<sup>a</sup>, Ya. V. Gorina<sup>a</sup>, A. I. Mosyagina<sup>a</sup>,  
A. V. Vasiliev<sup>a</sup>, N. A. Malinovskaya<sup>a</sup>, and Yu. K. Komleva<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of the Ministry of Healthcare  
of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russia*

*\*e-mail: yuliakomleva@mail.ru*

Aging is accompanied by numerous pathophysiological mechanisms, which include inflammation, cellular senescence and development of the *senescence-associated secretory phenotype* (SASP), altered glucose tolerance, and insulin resistance (IR). A significant contribution to the development of brain IR is made by neuroinflammation due to the activation of the multiprotein complex – NLRP3 inflammasome. The aim of research was to study the disruption of the mechanisms of insulin signaling and metabolic inflammation in the brain in aged C57BL/6 mice. We found that in aging mice there is an increase in the number of senescent cells in brain sections and coculture of astrocytes and neurons, as well as an increase in the expression of phosphorylated protein kinases PKR and IKK $\beta$ , components of metaflammasomes. Another component of the metaflammasome, whose expression increased in the hippocampus during aging, was IKK $\beta$ . In our research, it was shown that constitutive IKK $\beta$  activation is associated with cell senescence and aging, as well as overactivation of the NLRP3 inflammasome and increased lactate in aging mice. Changes in the expression of inflammasomes in the brain are reflected in changes in complex behavior. This study documented impairment of contextual memory in aging mice, but not acquisition and signaling memory. However, aging in mice did not result in a change in the expression of insulin receptors, insulin receptor substrate 1 (IRS1phospho-S312). This suggests that during physiological aging, without signs of neurodegeneration, reactive astrogliosis, there are still no deterioration of insulin signaling, but manifestations of metabolic inflammation are already observed. Thus, modulation of the activity of the PKR and IKK $\beta$  metaflammasome components may be a new pathogenetically substantiated strategy for controlling the mechanisms of metabolic inflammation and developing *senescence-associated secretory phenotype* in the brain to improve age-dependent cognitive dysfunction.

**Keywords:** insulin resistance, metaflammasome, immunosenescence, inflammasome, secretory phenotype

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО  
ЭФФЕКТА ИНГИБИТОРОВ НАТРИЙ-ГЛЮКОЗНОГО  
КОТРАНСПОРТЕРА 2-го ТИПА

© 2022 г. А. В. Симаненкова<sup>1, 2, \*</sup>, О. С. Фукс<sup>1</sup>, Н. В. Тимкина<sup>1, 2</sup>, Т. Л. Каронова<sup>1, 2</sup>,  
Д. Л. Цыба<sup>3</sup>, О. В. Кирик<sup>3</sup>, Д. Э. Коржевский<sup>3</sup>, Т. Д. Власов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия  
\*E-mail: annasimanenkova@mail.ru

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

После доработки 01.08.2022 г.

Принята к публикации 10.08.2022 г.

Ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа (иНГЛТ-2) обладают доказанными кардиопротективными свойствами, что делает этот класс препаратов одним из приоритетных в лечении пациентов с сахарным диабетом (СД) 2-го типа. Ишемический инсульт и хроническое нарушение мозгового кровообращения встречаются при СД с высокой частотой, что обуславливает актуальность изучения нейротропных свойств иНГЛТ-2. Целью нашего исследования явилось изучение и сопоставление нейропротективного действия высокоселективного иНГЛТ-2 эмпаглифлозина (ЭМПА) и низкоселективного иНГЛТ-2 канаглифлозина (КАНА) на модели острой ишемии головного мозга и изучение вероятного механизма влияния данных препаратов на головной мозг. На первом этапе ЭМПА и КАНА вводились крысам Вистар без СД в течение 7 дней до моделирования транзиторной фокальной 30-минутной ишемии головного мозга. Через 48 ч реперфузии оценивался неврологический дефицит по шкале Garcia, затем срезы мозга инкубировались в растворе трифенилтетразолия хлорида для изучения объема некроза. Объем повреждения ткани мозга в группах “ЭМПА” и “КАНА” не различался и был достоверно меньше, чем в группе контроля – у крыс, не получавших препаратов. При этом ни ЭМПА, ни КАНА не оказывали достоверного влияния на неврологический дефицит. На втором этапе мы моделировали СД 2-го типа (высокожировая диета и никотинамид + стрептозотоцин), через 4 нед. после чего была иницирована 8-недельная терапия ЭМПА и КАНА. По истечении срока терапии производилось иммуногистохимическое исследование ткани мозга. Развитие СД 2-го типа сопровождалось увеличением числа микроглиоцитов в СА1 зоне гиппокампа; терапия ЭМПА, но не КАНА, привела к уменьшению числа активированных микроглиоцитов. Таким образом, высокоселективный иНГЛТ-2 ЭМПА и низкоселективный иНГЛТ-2 КАНА обладают сходным инфаркт-лимитирующим эффектом при применении их в течение 7 дней до моделирования ишемии у крыс Вистар без СД. Эффект ЭМПА в отношении головного мозга при СД может быть частично обусловлен уменьшением активации микроглии.

*Ключевые слова:* сахарный диабет, нейропротекция, ишемия головного мозга, ингибитор натрий-глюкозного котранспортера, микроглия

DOI: 10.31857/S0869813922090035

Сахарный диабет (СД) 2-го типа является независимым фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, в том числе инфаркт миокарда и ишемический инсульт. По данным Атласа Международной диабетической Федерации 2021 г., ишемический инсульт является одной из ведущих причин смерти больных СД 2-го типа [1]. Частота инсульта среди больных СД 2-го типа по разным данным в 2–6 раз выше, чем у лиц без СД [2]. СД 2-го типа приводит к развитию хронического нарушения мозгового кровообращения, которое, не вызывая очаговой неврологической симптоматики, проявляется когнитивными расстройствами той или иной степени выраженности.

Современные российские и зарубежные алгоритмы по лечению пациентов с СД 2-го типа [3, 4] рекомендуют в первую очередь отдавать предпочтение сахароснижающим препаратам с доказанной способностью уменьшать частоту сердечно-сосудистых событий. Так, у пациентов, имеющих сердечно-сосудистые заболевания атеросклеротического генеза, такие как инфаркт миокарда или острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) в анамнезе, сердечную недостаточность или даже совокупность факторов сердечно-сосудистого риска, препаратами выбора будут ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа (иНГЛТ-2) и агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (аГПП-1).

В настоящее время известно, что среди широкого многообразия имеющихся на фармакологическом рынке сахароснижающих лекарственных средств только дулаглутид и семаглутид, относящиеся к длительно действующим аГПП-1, способны достоверно уменьшать риск развития ишемического инсульта [5, 6].

Препараты из группы иНГЛТ-2, будучи одними из передовых классов сахароснижающих лекарственных средств с точки зрения кардиопротекции, не продемонстрировали достоверного нейропротективного эффекта в плане влияния на частоту инсультов. По данным большинства мета-анализов, эффекты данной группы препаратов можно считать нейтральными одинаково в отношении как фатальных, так и нефатальных инсультов, а также относительно влияния на частоту развития инсультов в целом. В то же время, примечательно, что наблюдаются некоторые различия во влиянии препаратов на частоту различных подтипов инсультов. В мета-анализе 2021 г. производилось сопоставление результатов международных рандомизированных исследований и было показано, что ни один из исследуемых иНГЛТ-2 не привел к уменьшению частоты развития ишемического инсульта и транзиторных ишемических атак. В то же время терапия канаглифлозином (КАНА), по данным исследования CANVAS, привела к снижению риска геморрагического инсульта (RR = 0.434, 95% CI 0.207–0.912,  $p = 0.027$ ) [7].

Кроме того, в последние годы появляется все больше сведений о положительном влиянии иНГЛТ-2 на риск развития нарушений ритма, в частности фибрилляции предсердий. Результаты мета-анализа 2021 г. показали, что применение иНГЛТ-2 ассоциировано со снижением риска фибрилляции предсердий на 18% (RR 0.82, 95% CI 0.70–0.96) и закономерно сопровождается уменьшением риска кардио-эмболического подтипа ишемического инсульта на 68% (RR 0.32, 95% CI 0.12–0.85), по сравнению с плацебо [8].

Таким образом, сведения о потенциальном нейропротективном эффекте иНГЛТ-2 на данный момент немногочисленны и частично противоречивы. Однако предположения к наличию такого эффекта у данного класса сахароснижающих препаратов есть и обусловлены их широким защитным профилем в отношении сердечно-сосудистой системы, а также экспрессией натрий-глюкозного котранспортера как первого, так и второго типа в ткани головного мозга и в эндотелии сосудов [9].

Целью нашей работы стало изучение потенциального нейропротективного эффекта высокоселективного иНГЛТ-2 эмпаглифлозина (ЭМПА) и низкоселективного иНГЛТ-2 канаглифлозина (КАНА) в условиях острой ишемии головного моз-

га и исследование механизмов положительного влияния данных препаратов на головной мозг при сахарном диабете 2-го типа.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Соблюдении биоэтических норм*

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю содержания и использования лабораторных животных (IACUC) Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова.

Проведенное нами исследование включало два этапа.

На первом этапе мы изучали потенциальные защитные свойства иНГЛТ-2 при введении их в течение 7 дней до моделирования ишемического инсульта животным без нарушений углеводного обмена. Такой дизайн исследования позволяет создать “чистую” модель ОНМК и феноменологически подтвердить наличие у препарата самостоятельного нейропротективного эффекта, не связанного с его положительным влиянием на гликемический профиль.

Задачей второго этапа было изучение возможных механизмов реализации нейротропного эффекта высоко- и низкоселективных иНГЛТ-2. Для этого мы воспроизвели СД 2-го типа, рассматривая его как модель хронического повреждения головного мозга. Мы отказались от попытки исследования нейропротективных свойств препаратов на фоне моделирования острой ишемии, так как механизмы защиты в условиях острого состояния принципиально сходны и сводятся преимущественно к противовоспалительному, антиапоптотическому и другим эффектам. Механизмы же реализации защитного эффекта препаратов именно в условиях хронического повреждения представляют научный и практический интерес.

### *Первый этап*

Исследование проводилось на крысах-самцах стока Вистар (масса 420–470 г),  $n = 32$ .

Крысы содержались не более, чем по 5 голов в одной клетке при неограниченном потреблении корма и воды, при фиксированном световом режиме 12.00 : 12.00 ч (свет : темнота). Температура поддерживалась в пределах 22–25°C, относительная влажность – 50–70%.

Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводился ежедневный осмотр каждого животного. Оценивались окраска кожи и видимых слизистых, поведение, характер двигательной активности, наличие судорог, изменение характера дыхательных движений, положение хвоста. Взвешивание производилось при поступлении животных и в период карантина – не реже 1 раза в неделю. Животные, имевшие отклонения по массе тела, общему состоянию или поведению, не были включены в эксперимент.

Были сформированы следующие группы животных:

- Группа “КОНТРОЛЬ” ( $n = 12$ ) – введение 0.9%-ного раствора NaCl 1 мл *per os*, 1 раз в день, 7 дней до ишемии мозга;
- Группа “ЭМПА” ( $n = 8$ ) – терапия эмпаглифлозином *per os* 2 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней до ишемии мозга;
- Группа “КАНА” ( $n = 8$ ) – терапия канаглифлозином *per os* 25 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней до ишемии мозга.

Ежедневно в одно и то же время производилось измерение массы тела крыс всех групп, а также массы потребляемого корма.

Кроме того, трехкратно (на второй, четвертый и шестой дни эксперимента) производилось определение уровня гликемии. Гликемия оценивалась в одно и то же время, при этом животное находилось на свободном потреблении корма. Производилась пункция хвостовой вены, после чего содержание глюкозы в полученной капле венозной крови определялось при помощи прибора определения гликемии и кетонемии StatStrip (Nova Biomedical, США). Нормальными считались значения гликемии от 3.3 до 7.8 ммоль/л, поскольку измерение производилось в течение дня (не натощак).

Транзиторная фокальная ишемия головного мозга воспроизводилась по достижении хирургической стадии наркоза (Золетил + Ксилазин в/м) с помощью модели транзиторной окклюзии левой средней мозговой артерии по методике Koizumi с соавт. в модификации Longa [10]. Методика заключается во введении окклюдера — нити длиной 20–22 мм (Doccol Corporation, США) во внутреннюю сонную артерию на глубину 20–22 мм до места отхождения средней мозговой артерии, устье которой перекрывается вводимым окклюдером. В результате введения нити происходит ишемизация мозга в бассейне левой средней мозговой артерии. Верификация снижения регионарного кровотока на фоне окклюзии осуществлялась при помощи доплерографии (Минимакс-Допплер-К модель НБ, Россия). Доступ к корковой ветви левой средней мозговой артерии производился через трепанационное окно. Уменьшение линейной скорости кровотока на 70% и более по сравнению с исходной свидетельствовало о наличии ишемии в исследуемом бассейне. Длительность окклюзии составляла 30 мин, после чего нить извлекалась, рана ушивалась.

Во время проведения оперативного вмешательства, а также в послеоперационном периоде до момента прекращения действия наркоза производился динамический контроль гликемии при помощи повторных пункций хвостовой вены, а также контроль ректальной температуры животного, которая поддерживалась на уровне 37.0°C при помощи терморегулирующего столика.

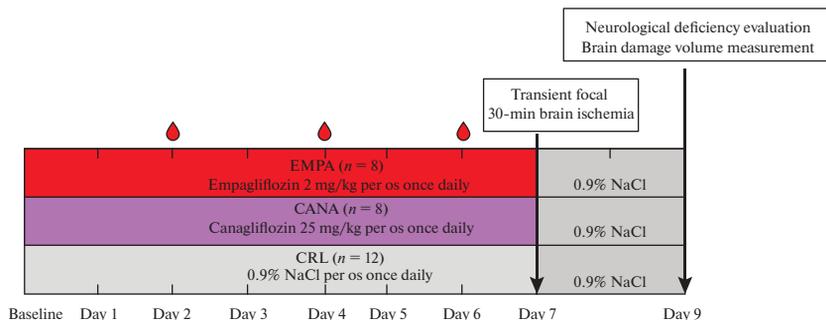
После моделирования ишемии (с момента выхода из наркоза) каждое животное было помещено в отдельную клетку.

В течение последующих двух суток (48 ч) не менее 3 раз в сутки осуществлялось определение гликемии по указанной выше методике.

Животные всех групп в течение реперфузионного периода получали 1 мл 0.9%-ного раствора NaCl per os 1 раз в день. Введение исследуемых препаратов было прекращено, так как целью исследования было изучение их протективных свойств только при применении до инсульта, в качестве агентов прекодиционирования.

Через 48 ч реперфузии во всех группах оценивался неврологический дефицит по шкале Garcia [11]. Данная шкала включает параметры, позволяющие выявлять сенсорные и моторные нарушения у животных, перенесших фокальную ишемию головного мозга в бассейне левой средней мозговой артерии. В соответствии с данной шкалой здоровое животное имеет 18 баллов, в то время как максимально выраженный неврологический дефицит характеризуется 3 баллами (табл. 1).

После оценки неврологического дефицита производилось извлечение материала головного мозга для определения объема повреждения при помощи окраски срезов мозга 1%-ным раствором трифенилтетразолия хлорида. Для этого изготавливались пять срезов головного мозга толщиной 2 мм. Срезы мозга инкубировались в 1%-ном растворе трифенилтетразолия хлорида (MP Biomedicals, США) в течение 15 мин при температуре 37°C и pH 7.4. После инкубации обе поверхности всех срезов фотографировались цифровой камерой Olympus C-4000, сопряженной с помощью микрофотографического устройства с микроскопом МБС10 (ЛОМО, Санкт-



**Рис. 1.** Дизайн первого этапа эксперимента. – взятие крови из хвостовой вены для определения гликемии. Transient focal 30-min brain ischemia – транзиторная фокальная 30-минутная ишемия мозга. Neurological deficiency evaluation – оценка неврологического дефицита. Brain damage volume measurement – измерение объема повреждения мозга.

Санкт-Петербург). Цифровые изображения срезов в последующем обрабатывались компьютерным методом с помощью программ ImageJ, Adobe Photoshop 8.0, которые позволяют рассчитать площадь зоны некроза. Затем при помощи суммации результата по всем срезам вычислялся объем повреждения мозга, по отношению к общему объему мозга (в %).

Дизайн первого этапа исследования представлен на рис. 1.

### Второй этап

На втором этапе исследования крысы-самцы стока Вистар,  $n = 25$ , (масса 200–255 г) по истечении акклиматизационного периода (14 дней) в течение 28 дней содержались на диете с высоким содержанием насыщенных жиров (22%) – общая экспериментальная группа.

**Таблица 1.** Шкала оценки неврологического дефицита J.N. Garcia (адаптировано из [11])

Параметр	Количество баллов			
	0	1	2	3
Спонтанная активность (в клетке в течение 5 мин)	Движения отсутствуют	Едва двигается	Двигается, но не приближается по крайней мере к трем сторонам клетки	Двигается и достигает по крайней мере трех сторон клетки
Симметричность движений (4 конечности)	Правая сторона: отсутствует движение	Правая сторона: небольшое движение	Правая сторона: двигается медленно	Обе стороны двигаются симметрично
Симметричность предплечий (крыса вытягивает конечности, когда ее держат за хвост)	Правая сторона: отсутствует движение, отсутствует вытягивание конечностей	Правая сторона: небольшое движение, чтобы вытянуть конечности	Правая сторона: двигается и пытается вытянуть конечность меньше, чем с левой стороны	Симметричные вытягивания
Забирается по стенке проволочной клетки	–	Не удается забраться	Правая сторона слабая	Нормально забирается
Реакция на прикосновение к каждой стороне туловища	–	Отсутствует ответ с правой стороны	Слабый ответ с правой стороны	Симметричный ответ
Ответ на прикосновение к вибриссам	–	Отсутствует ответ с правой стороны	Слабый ответ с правой стороны	Симметричный ответ

Через 4 недели у всех животных определялась гликемия посредством пункции хвостовой вены, как описано выше, при помощи прибора определения гликемии и кетонемии StatStrip (Nova Biomedical, США), затем вводился раствор никотинамида (Nicotinamide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) 230 мг/кг внутривенно в качестве панкреатопротектора, через 15 мин – раствор стрептозоцина (Streptozocin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) 60 мг/кг внутривенно в качестве панкреатотоксина [12].

В течение всего последующего эксперимента крысы общей экспериментальной группы продолжали находиться на диете с повышенным содержанием насыщенных жиров.

На вторые и третьи сутки после введения стрептозоцина и никотинамида производилось определение гликемии по описанной методике. При выявлении в 2 измерениях, выполненных в разные дни, гликемии больше 11.1 ммоль/л диагностировался СД [13, 14]. При обнаружении меньших значений гликемии хотя бы в одном из измерений выполнялся пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ). Измерение гликемии производилось исходно (натощак), а также через 15, 30 и 60 мин после зондового введения 40%-ного раствора глюкозы в расчете 3 г/кг массы тела животного. При определении гликемии натощак нормальными значениями считались до 6.1 ммоль/л, уровень 6.1–7.0 ммоль/л расценивался как “серая” зона, гликемия больше 7.0 ммоль/л натощак соответствовала критериям СД. При выявлении во время ПГТТ, после введения глюкозы, в любой из точек гликемии 11.1 ммоль/л и больше, при наличии или отсутствии гипергликемии натощак, диагностировался СД. При выявлении меньших значений данная патология не подтверждалась, и животные исключались из дальнейшего эксперимента.

Наблюдение за животными продолжалось еще 28 дней с момента индукции СД. При появлении на данном этапе симптомов, характерных для абсолютной инсулиновой недостаточности, то есть клинической картины СД 1-го типа (полидипсия, полиурия, интенсивная потеря массы тела), эти животные исключались из дальнейшего эксперимента.

Через 28 дней животные были разделены на группы ( $n = 5$  в каждой):

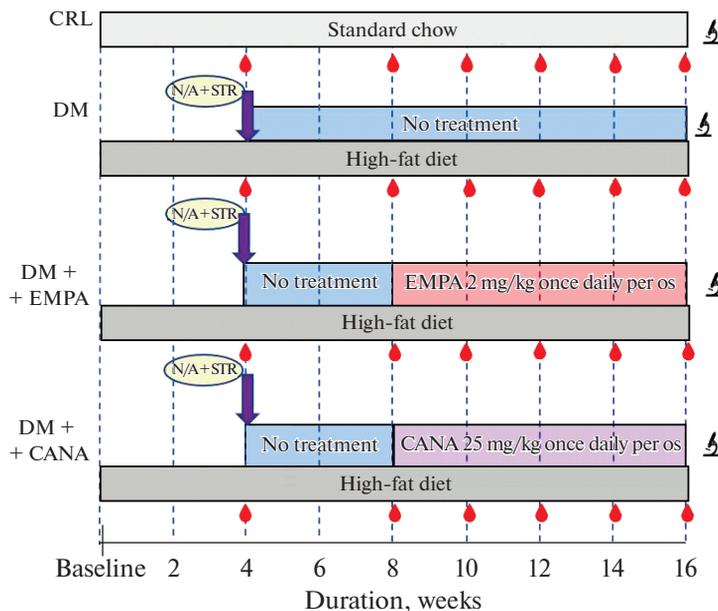
- Группа “СД” – СД без лечения (56 дней);
- Группа “СД + ЭМПА” – терапия эмпаглифлозином *per os* 2 мг/кг 1 раз в день 56 дней;
- Группа терапия “СД + КАНА” – терапия канаглифлозином *per os* 25 мг/кг 1 раз в день 56 дней.

Также была создана группа здоровых животных “Контроль” ( $n = 5$ ), которые находились на стандартном корме и не подвергались никаким интервенциям в течение всего эксперимента.

Во всех группах на протяжении всего эксперимента 1 раз в 2 дня измерялись масса животных и масса потребленного корма.

Через 8 недель проведения соответствующей терапии выполнялась эвтаназия, затем головной мозг животных аккуратно извлекали с сохранением мягкой мозговой и паутинной оболочек, фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [15], обезвоживали и заливали в парафин обычным способом. Морфологическому исследованию подвергали фронтальные срезы конечного мозга толщиной 5 мкм на уровне  $-3.36 \text{ мм} \pm 0.12 \text{ мм}$  относительно брегмы согласно анатомического атласу [16].

Выявление микроглиоцитов в структурах переднего мозга осуществляли при помощи иммуноцитохимического маркирования с использованием козьих поликлональных антител к Iba-1 в разведении 1 : 1000 (Abcam, Великобритания). В качестве вторичных реагентов использовали набор VECTASTAIN Universal Quick HRP kit (Vector Labs, США). Пероксидазную метку выявляли с использованием диаминобензидинового хромогена (DAB+; Agilent, США).



**Рис. 2.** Дизайн второго этапа исследования. CRL, Контроль – группа “КОНТРОЛЬ”, DM, СД – группа “СД”, DM + EMPA, СД + ЭМПА – группа “СД + ЭМПА”, DM + CANA, СД + КАНА – группа “СД + КАНА”, N/A, H/A – никотинамид, STR, СТР – стрептозотоцин.  – взятие крови из хвостовой вены для определения гликемии.  – иммуногистохимическое исследование головного мозга

Дизайн второго этапа исследования показан на рис. 2.

### Статистический анализ

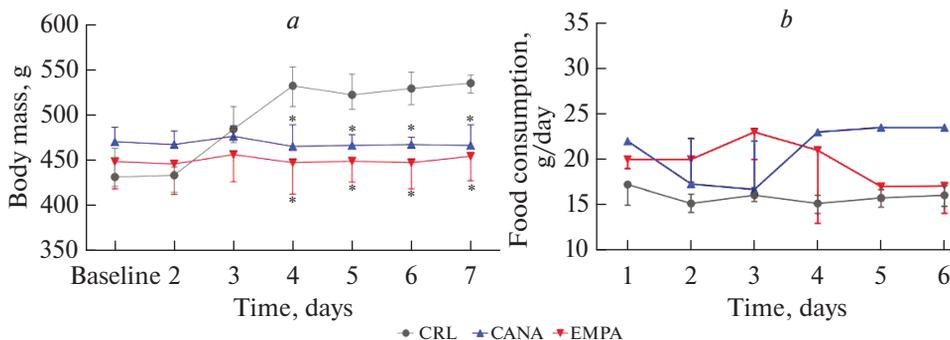
Статистическая обработка данных производилась при помощи программного пакета IBM SPSS Statistics-22 (IBM, США) и Statistica-10 (Statsoft, США). Статистический анализ производился при помощи непараметрических методов. Значимость различий между группами оценивалась с помощью непараметрического критерия Крускала–Уоллеса и Манна–Уитни для независимых выборок, с применением непараметрического дисперсионного анализа (апостериорное попарное сравнение групп при помощи критерия Данна). Все показатели представлены в виде “медиана (25%; 75%)”. Значения  $p$  меньше 0.05 рассматривались как значимые.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Первый этап

Применение как ЭМПА, так и КАНА у здоровых животных привело к замедлению физиологической прибавки массы тела по сравнению с контрольной группой, не получавшей терапии. При этом различий в динамике массы тела между группами “ЭМПА” и “КАНА” не было (рис. 3а).

Потребление корма у животных, получавших КАНА, первоначально имело тенденцию к снижению, однако с четвертого дня наблюдения, напротив, стало нарастать и достоверно превысило таковое в контрольной группе. На фоне терапии ЭМПА имела место противоположная тенденция. Так, первоначально по-



**Рис. 3.** Динамика массы тела и потребления корма у животных в ходе первого этапа исследования. (а) Динамика массы тела. (б) Динамика потребления корма. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой “Контроль”, § –  $p < 0.05$  между группами “ЭМПА” и “КАНА”.

ребление корма в этой группе было стабильно высоким, однако в дальнейшем стало снижаться (рис. 3б).

На фоне применения обоих иНГЛТ-2 в течение 7 дней у животных без СД уровень гликемии оставался в пределах нормы, эпизодов гипогликемии зафиксировано не было (табл. 2).

Мониторинг гликемии во время оперативного вмешательства, моделирования транзиторной фокальной ишемии головного мозга, показал, что применение обоих иНГЛТ-2 предотвращает интраоперационную гипергликемию, имевшую место в контрольной группе на фоне применения наркоза. При этом эпизодов гипогликемии также зафиксировано не было (табл. 3).

В табл. 4 представлены средние значения гликемии в течение первых и вторых суток в исследуемых группах. Необходимо отметить, что в течение первых суток, на фоне продолжавшегося действия наркоза, до восстановления сознания и возможности потреблять пищу, у 2 животных в группе “ЭМПА” и 3 животных в группе “КАНА” наблюдались эпизоды гипогликемии. Так, минимальные зафиксированные значения гликемии составили 2.8 и 3.1 ммоль/л в группах “ЭМПА” и “КАНА” соответственно. Это потребовало неотложных мероприятий по купированию ги-

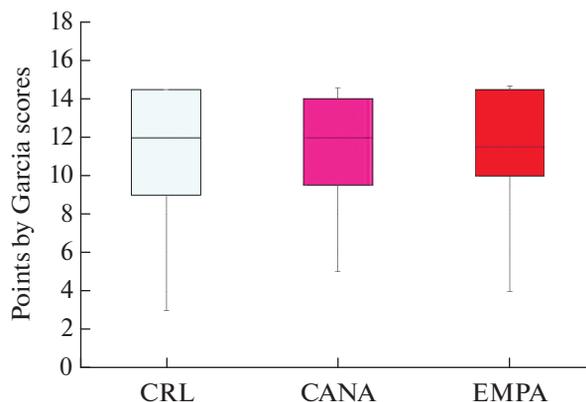
**Таблица 2.** Уровень гликемии (ммоль/л) до моделирования ишемии головного мозга

	День 2	День 4	День 6
Группа “Контроль”	5.6 (5.3; 7.3)	5.0 (4.8; 6.8)	5.2 (4.7; 7.0)
Группа “ЭМПА”	5.3 (5.0; 7.0)	4.9 (4.5; 6.9)	5.1 (4.9; 7.1)
Группа “КАНА”	5.1 (4.7; 7.2)	5.0 (4.4; 6.0)	5.9 (5.5; 6.3)

**Таблица 3.** Уровень гликемии (ммоль/л) во время моделирования ишемии головного мозга

	Измерение 1	Измерение 2	Измерение 3
Группа “Контроль”	16.7 (14.5; 16.9)	18.8 (12.8; 18.8)	15.9 (12.5; 17.8)
Группа “ЭМПА”	9.3 (6.6; 14.3)*	7.1 (5.9; 11.7)*	6.2 (4.5; 7.8)*
Группа “КАНА”	11.6 (8.4; 15.1)*	4.8 (4.5; 7.0)*	10.4 (9.5; 11.0)*

\* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой “Контроль”.



**Рис. 4.** Неврологический статус, оценка по шкале Garcia [11]. Максимальный неврологический дефицит = 3 балла, здоровое животное = 18 баллов.

погликемии – введения 5%-ного раствора глюкозы подкожно, а после восстановления сознания – 40%-ного раствора глюкозы через желудочный зонд. Эти животные были исключены из дальнейшего анализа. С учетом полученных данных, в последующем мы производили подкожное введение 5%-ного раствора глюкозы по окончании оперативного вмешательства для предотвращения гипогликемии, а также при появлении тенденции к низко-нормальной гликемии повторно в течение первых суток, до выхода из наркоза.

В связи с необходимостью исключения указанных пяти животных из эксперимента в дальнейшем группы “ЭМПА” и “КАНА” были дополнены еще двумя и тремя крысами соответственно – с целью сохранения исходно запланированного количества животных в группах.

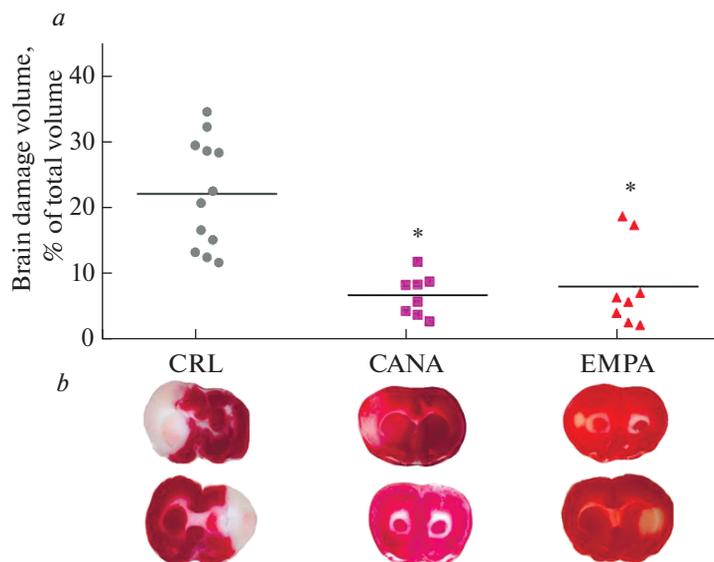
При оценке выраженности неврологического дефицита при помощи шкалы Garcia мы не выявили достоверных различий между группами “ЭМПА”, “КАНА” и “Контроль” (рис. 4).

При этом применение как ЭМПА, так и КАНА в течение 7 дней до моделирования транзиторной фокальной ишемии головного мозга привело к достоверному уменьшению объема повреждения ткани мозга по сравнению с группой контроля. Достоверных различий в выраженности инфаркт-лимитирующего эффекта между группами “ЭМПА” и “КАНА” не было (рис. 5).

Летальности в ходе проведения оперативного вмешательства и в послеоперационном периоде не было, в связи с чем из эксперимента выбыли только животные, у которых была зафиксирована гипогликемия ( $n = 5$ ).

**Таблица 4.** Уровень гликемии (ммоль/л) после моделирования ишемии головного мозга

	День 1	День 2
Группа “Контроль”	6.7 (5.5; 6.9)	7.5 (6.8; 8.0)
Группа “ЭМПА”	4.3 (4.3; 5.3)	5.1 (4.5; 5.3)
Группа “КАНА”	5.0 (4.8; 5.7)	4.8 (4.5; 6.1)



**Рис. 5.** Объем повреждения мозга в результате моделирования транзиторной фокальной ишемии. (а) – размер инфаркта мозга, представленный в виде точечных графиков с медианой, (б) – репрезентативные срезы головного мозга. \* –  $p < 0.05$ , по сравнению с группой “Контроль”.

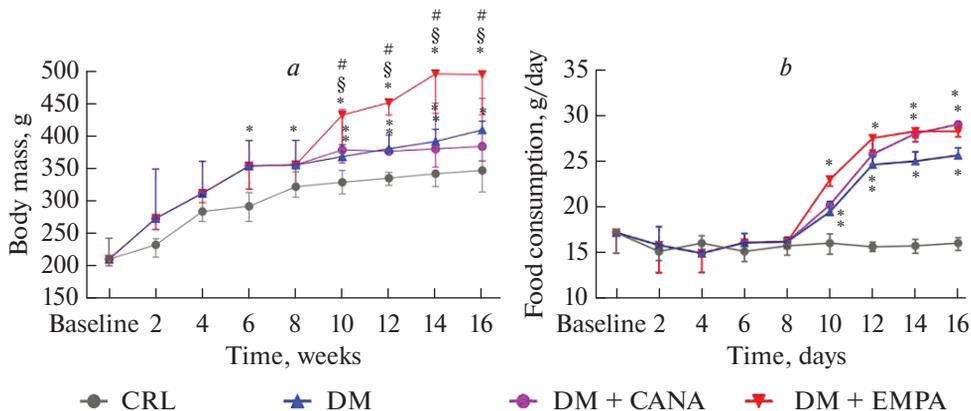
### Второй этап

При моделировании СД в ходе проведения ПГТТ у одного животного не удалось зафиксировать нарушений углеводного обмена (уровень гликемии не выходил за пределы нормы натощак и во всех точках измерения после введения раствора глюкозы), у трех животных значения гликемии находились в “серой” зоне, что соответствовало нарушению толерантности к глюкозе. Эти животные были исключены из дальнейшего эксперимента. У одного животного после моделирования СД развилась симптоматика, характерная для СД 1-го типа (обильное потребление жидкости, полиурия и интенсивная потеря массы тела) – это животное также было исключено. Таким образом, опыт был продолжен на 20 крысах (по 5 крыс в каждой группе).

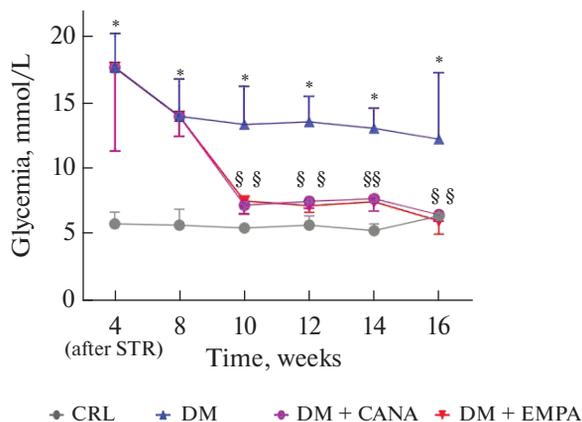
Развитие СД 2-го типа сопровождалось более интенсивным набором массы тела по сравнению с группой контроля с отсутствием нарушений углеводного обмена. При этом набор массы тела был сопоставим в группах “СД” и “СД + КАНА”, в то время как в группе “СД + ЭМПА” данный параметр был достоверно выше (рис. 6а). В то же время потребление корма было сходным в группах “СД” без лечения, а также на фоне обоих вариантов сахароснижающей терапии (в группах “СД + ЭМПА” и “СД + КАНА”) и превышало таковое в группе “Контроль” (рис. 6б).

Уровень гликемии в группе “СД” был достоверно выше, чем в группе “Контроль” на протяжении всего эксперимента. Применение как ЭМПА, так и КАНА вызвало стойкую нормализацию гликемического профиля, достоверных различий между сахароснижающей эффективностью данных двух препаратов не было. Эпизодов гипогликемии не наблюдалось (рис. 7).

Иммуногистохимическое исследование с использованием специфического маркера микроглии Iba-1 выявило присутствие рамифицированной микроглии во всех областях головного мозга. Проведенный количественный анализ показал, что в зоне stratum radiatum CA1 области гиппокампа у животных группы “СД” количество



**Рис. 6.** Динамика массы тела и потребления корма в ходе второго этапа исследования. (а) – динамика массы тела. (б) – динамика потребления корма. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой “Контроль”, § –  $p < 0.05$  по сравнению с группой “СД”, # –  $p < 0.05$  между группами “ЭМПА” и “КАНА”.



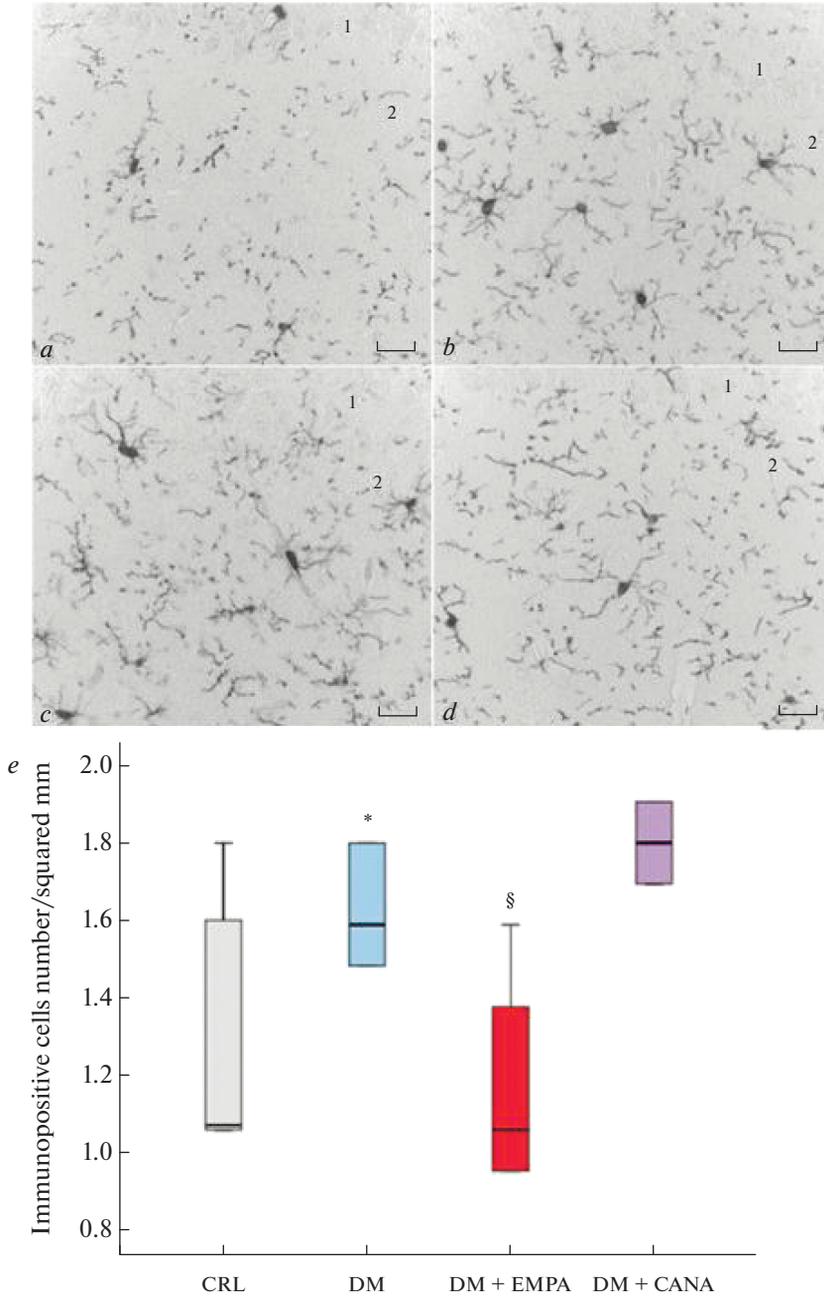
**Рис. 7.** Динамика гликемии в ходе второго этапа исследования. STR – стрептозотоцин. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой “Контроль”, § –  $p < 0.05$  по сравнению с группой “СД”.

клеток микроглии достоверно больше, чем у здоровых животных контрольной группы. Данная зона была выбрана для анализа в связи с тем, что нейроны области СА1 гиппокампа высокочувствительны к разного рода воздействиям. В зоне stratum radiatum проходят дендриты этих нейронов, на повреждение которых реагирует микроглия. Кроме того, изучаемая область имеет хорошо определяемые слои, что позволяет проводить сравнения данной области у разных животных.

Применение ЭМПА приводило к уменьшению числа клеток микроглии в исследуемой зоне по сравнению с группой “СД” – количество микроглиоцитов в группе “СД + ЭМПА” не отличалось от такового в контрольной группе. Терапия КАНА достоверно не повлияла на данный показатель (рис. 8).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное нами исследование показало, что иНГЛТ-2 при применении у здоровых животных без нарушений углеводного обмена способны нивелировать есте-



**Рис. 8.** Результаты иммуногистохимической реакции на микроглиальный маркер Iba-1. (a)–(d) – микрофотографии области CA1 гиппокампа (1) и stratum radiatum (2): (a) – “Контроль”, (b) – “СД”, (c) – “СД + КАНА”, (d) – “СД + ЭМПА”. Масштабный отрезок равен 20 мкм. (e) – количество Iba-1-иммунопозитивных клеток на 1 мм<sup>2</sup> в зоне stratum radiatum области CA1 гиппокампа. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой “Контроль”, § –  $p < 0.05$  по сравнению с группой “СД”.

ственный прирост массы тела. В то же время мы отметили, что у крыс с СД терапия ЭМПА не вызывала снижения массы тела, приводя даже к некоторому ее приросту, чего не наблюдалось при применении КАНА. При этом потребление корма на фоне терапии ЭМПА и КАНА было сходным. Последнее может объясняться тем, что КАНА действует не только на уровне натрий-глюкозного котранспортера (НГЛТ) 2-го типа, но также и на уровне НГЛТ 1-го типа, уменьшая всасывание глюкозы в кишечнике [17]. Таким образом, КАНА, не уменьшая потребления корма, более значимо контролирует массу тела.

Мы не зафиксировали эпизодов гипогликемии при применении как ЭМПА, так и КАНА у крыс без СД на фоне отсутствия каких-либо вмешательств. В то же время в раннем постинсультном периоде у нескольких животных обеих групп были зарегистрированы эпизоды тяжелой гипогликемии, что потребовало их исключения из дальнейшего эксперимента. Данное состояние имело место до выхода животных из наркоза и, следовательно, до начала самостоятельного потребления пищи. Нам не удалось найти подтверждение подобного феномена в работах других авторов. Однако имеются единичные данные о том, что иНГЛТ-2 способен модулировать внутрипеченочные эффекты глюкагона, снижая активность и экспрессию глюкагонового рецептора [18], что может predispose к снижению активности контринсулярного ответа и, тем самым, к развитию гипогликемии.

Наше исследование стало первым в своем роде, позволившим оценить и сопоставить нейропротективный эффект высоко- и низкоселективных иНГЛТ-2 на модели острой транзиторной ишемии головного мозга. Ранее подобные работы не проводились.

Протективное действие высокоселективного иНГЛТ-2 ЭМПА при остром повреждении головного мозга описано в работе 2020 г., в которой ишемия головного мозга у крыс с СД моделировалась при помощи 30-минутной двусторонней окклюзии обеих общих сонных артерий. Авторы сравнивали инфаркт-лимитирующий эффект ЭМПА и производного сульфонилмочевины гликлазида при введении их через 1 и 24 ч после начала реперфузии. Было показано, что применение ЭМПА позволяет достоверно уменьшить объем повреждения мозга и улучшить неврологический статус по сравнению с гликлазидом, что сопровождается уменьшением выраженности оксидативного стресса и воспаления [19]. В другой работе 2021 г. ЭМПА вводился внутрибрюшинно за 1 ч до моделирования ишемии у здоровых крыс без СД. Авторы показали, что применение ЭМПА способно оказывать антиоксидантный и противовоспалительный эффект, тем самым защищая головной мозг в условиях ишемического-реперфузионного повреждения. В то же время в данной работе не осуществлялась оценка потенциального инфаркт-лимитирующего действия препарата [20].

Данные о протективном эффекте КАНА при ишемии головного мозга в эксперименте нами найдены не были.

По результатам проведенного нами исследования ни ЭМПА, ни КАНА не оказали достоверного влияния на выраженность неврологического дефицита при оценке по шкале Garcia. Нельзя исключить, что примененная шкала не обладает достаточной степенью чувствительности при данном дизайне эксперимента, так как отражает только грубые нарушения сенсорной и моторной функции. Кроме того, возможно, определенный вклад в отсутствие полноценного функционального восстановления после инсульта внес низко-нормальный уровень гликемии в раннем постинсультном периоде. Крысы, у которых развилась гипогликемия, были исключены из эксперимента, остальным животным осуществлялась профилактика данного состояния, однако низко-нормальные значения гликемии до выхода животных из наркоза имели место. Вероятно, данный уровень гликемии был недо-

статочен для поддержания энергетических потребностей в условиях ишемического-реперфузионного повреждения.

В то же время, мы показали, что иНГЛТ-2 способны ограничивать объем повреждения головного мозга при пролонгированном применении до моделирования транзиторной ишемии вне зависимости от степени селективности их влияния на НГЛТ.

Известно, что селективность ЭМПА приблизительно в 10 раз больше селективности КАНА [21], который ингибирует не только НГЛТ 2-го типа, но также и НГЛТ 1-го типа. НГЛТ 2-го типа экспрессируется преимущественно в проксимальных канальцах почек и ответственен за реабсорбцию около 90% глюкозы, попадающей в первичную мочу. НГЛТ 1-го типа представлен в слизистой оболочке тонкой кишки, в проксимальных канальцах почек, в миокарде, в капиллярах различных органов и тканей [17]. В последние годы появляется все больше данных об экспрессии обоих типов котранспортеров в ткани головного мозга. НГЛТ-1 представлен в пирамидных клетках коры, клетках Пуркинье мозжечка, в пирамидных и зернистых клетках гиппокампа [22]. Они также обнаруживаются в глиальных клетках вентромедиального отдела гипоталамуса [23]. НГЛТ-2 менее широко представлен в головном мозге и экспрессируется преимущественно в микрососудах гематоэнцефалического барьера, а также в области миндалевидного тела, гипоталамуса, ядра солитарного тракта [24, 25]. Кроме того, оба типа транспортеров обнаруживаются в эндотелии капилляров головного мозга [23]. Функция НГЛТ в головном мозге на настоящий момент остается предметом изучения, однако примечательно, что зоны, в которых обнаруживаются НГЛТ, ответственны за процесс обучения, за регуляцию потребления пищи, энергетический обмен, а также центральную регуляцию сердечно-сосудистой деятельности [25, 26]. НГЛТ 2-го типа, действуя в качестве глюкозного сенсора, в гипоталамусе ответствен за регуляцию цикла сна и бодрствования и аппетита [27].

Роль НГЛТ 1-го и 2-го типа в защите головного мозга в условиях повреждения, в том числе, ишемического-реперфузионного повреждения при инсульте или в условиях хронического нарушения мозгового кровообращения при СД 2 типа на настоящий момент изучена слабо.

Мы показали, что одним из механизмов воздействия иНГЛТ-2 на головной мозг при СД может быть уменьшение активации микроглии. Микроглия представляет собой резидентные макрофаги центральной нервной системы, основной регуляторный компонент барьерной системы головного мозга, в которую входят гематоэнцефалический, ликвороэнцефалический и гематоликворный барьеры. Количество наблюдаемых в очаге повреждения микроглиоцитов может отражать тяжесть поражения. Ранее было показано, что при диабетической ретинопатии происходит активация микроглиоцитов, что сопровождается гиперпродукцией провоспалительных факторов, что, в свою очередь, способствует прогрессированию ретинопатии [28]. Jackson и соавт. обнаружили прямую взаимосвязь между гиперактивацией микроглии и когнитивным снижением после перенесенного инсульта у животных с СД. В то же время подавление патологической гиперактивации микроглии способствует уменьшению воспаления, улучшает когнитивные функции после ишемии [29].

Результаты проведенного нами эксперимента показали, что количество микроглиоцитов в зоне stratum radiatum CA1 области гиппокампа при СД больше, чем у здоровых животных, в то время как терапия высокоселективным иНГЛТ-2 ЭМПА приводит к уменьшению количества данных иммунопозитивных клеток. Это позволяет предположить, что одним из механизмов нейропротективного действия ЭМПА при СД может быть противовоспалительный эффект, который, вероятно, преимущественно реализуется посредством НГЛТ 2-го типа. Низкоселективный КАНА может реализовывать свой защитный эффект в отношении головного мозга другим путем. Так, к примеру, было показано, что КАНА способен ингибировать

ацетилхолинэстеразу, что может приводить к улучшению когнитивной функции [30]. Кроме того, иНГЛТ-2 увеличивают концентрацию мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в ткани головного мозга. Данный фактор отвечает за рост нейронов, их выживаемость, нейропластичность. Дополнительно, BDNF считается важным фактором, участвующим в процессах обучения и запоминания [31]. Показано, что при СД уровень BDNF снижается, что ассоциировано с развитием когнитивной дисфункции у этих больных [32].

Таким образом, мы впервые показали, что высокоселективные и низкоселективные иНГЛТ-2 обладают сходным инфаркт-лимитирующим эффектом в условиях острого ишемического-реперфузионного повреждения головного мозга. Одним из механизмов реализации нейропротективного эффекта высокоселективных иНГЛТ-2 может являться уменьшение активации микроглии.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20163, <https://rscf.ru/project/22-25-20163/>.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Т.Д.В., Т.Л.К., Д.Э.К., А.В.С.), проведение эксперимента с животными (Н.В.Т., О.С.Ф., А.В.С.), выполнение иммуногистохимического исследования (Д.Л.Ц., О.В.К.), обработка данных (Н.В.Т., О.С.Ф., А.В.С., Д.Л.Ц., О.В.К.), написание и редактирование манускрипта (А.В.С., Т.Л.К., Т.Д.В., О.В.К., Д.Э.К.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *IDF Diabetes Atlas* 2021. Available at: <https://diabetesatlas.org/>
2. *Bottle A* (2009) Trends in cardiovascular admissions and procedures for people with and without diabetes in England 1996–2005. *Diabetologia* 52(1): 74–80. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1170-1>
3. *Дедов ИИ, Шестакова МВ, Майоров АЮ* (2021) Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Клиническая рекомендация 24(S1). [Dedov II, Shestakova MV, Mayorov AY (2021) Standards of specialized diabetes care. *Clinical Recommendations* 22(S1). (In Russ)]. <https://doi.org/10.14341/DM12802>
4. *Davies M, D'Alessio D, Fradkin J* (2018) Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia* 61(12): 2461–2498. <https://doi.org/10.2337/dci18-0033>
5. *Gerstein HC, Colhoun HM, Dagenais GR, Diaz R, Lakshmanan M, Pais P, Probstfield J, Riesenmeyer JS, Riddle MC, Rydén L, Xavier D, Atisso CM, Dyal L, Hall S, Rao-Melacini P, Wong G, Avanzum A, Basile J, Chung N, Conget I, REWIND Investigators* (2019) Dulaglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes (REWIND): a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 394(10193): 121–130. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31149-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31149-3)
6. *Marso SP, Bain SC, Consoli A, Eliaschewitz FG, Jódar E, Leiter LA, Lingvay I, Rosenstock J, Seufferth J, Warren ML, Woo V, Hansen O, Holst AG, Pettersson J, Vilsbøll T, SUSTAIN-6 Investigators* (2016) Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine* 375(19): 1834–1844. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607141>
7. *Tsai WH, Chuang SM, Liu SC, Lee CC, Chien MN, Leung CH, Liu SJ, Shih HM* (2021) Effects of SGLT2 inhibitors on stroke and its subtypes in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* 11(1): 15364. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94945-4>

8. *Li HL, Lip G, Feng Q, Fei Y, Tse YK, Wu MZ, Ren QW, Tse HF, Cheung BY, Yiu KH* (2021) Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2i) and cardiac arrhythmias: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Diabetol* 20(1): 100.  
<https://doi.org/10.1186/s12933-021-01293-8>
9. *Pawlos A, Broncel M, Woźniak E, Gorzelak-Pabiś P* (2021) Neuroprotective Effect of SGLT2 Inhibitors. *Molecules* 26(23): 7213.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26237213>
10. *Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G* (1986) Experimental studies of ischemic brain edema: I: A new experimental model of cerebral embolism in which recirculation can introduced into the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8(1): 1–8.  
<https://doi.org/10.3995/jstroke.8.1>
11. *Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ* (1995) Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 26(4): 627–634.  
<https://doi.org/10.1161/01.str.26.4.627>
12. *Bayrasheva VK, Babenko AY, Dobronravov VA, Dmitriev YV, Chefu SG, Pchelin IY, Ivanova AN, Bairamov AA., Alexeyeva NP, Shatalov IS, Grineva EN* (2016) Uninephrectomized High-Fat-Fed Nicotinamide-Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: A Model for the Investigation of Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res* 8317850.  
<https://doi.org/10.1155/2016/8317850>
13. *Adeyi AO, Idowu BA, Mafiana CF, Oluwalana SA, Ajayi OL, Akinloye OA* (2012) Rat model of food-induced non-obese-type 2 diabetes mellitus: comparative pathophysiology and histopathology. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 4(1): 51–58.
14. *Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L* (2008) The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. *Exp Diabet Res* 2008:704045.  
<https://doi.org/10.1155/2008/704045>
15. *Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP* (2015) Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem* 59(3): 2530.  
<https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530>
16. *Paxinos G, Watson Ch* (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Fourth Edition. San Diego. Acad Press.
17. *Yu AS, Hirayama BA, Timbol G, Liu J, Basarah E, Kepe V, Satyamurthy N, Huang S C, Wright EM, Barrio JR* (2010) Functional expression of SGLTs in rat brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 299(6): C1277–C1284.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00296.2010>
18. *Wang MY, Yu X, Lee Y, McCorkle SK, Chen S, Li J, Wang ZV, Davidson JA, Scherer PE, Holland WL, Unger RH, Roth MG* (2017) Dapagliflozin suppresses glucagon signaling in rodent models of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(25): 6611–6616.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1705845114>
19. *Amin EF, Rifaai RA, Abdel-Latif RG* (2020) Empagliflozin attenuates transient cerebral ischemia/reperfusion injury in hyperglycemic rats via repressing oxidative-inflammatory-apoptotic pathway. *Fundament Clin Pharmacol* 34(5): 548–558.  
<https://doi.org/10.1111/fcp.12548>
20. *Abed FN, Abbas EC, Al-Khalidi HA, AlMudhafar AM, Hadi NR* (2021) Anti-inflammatory and antioxidant effect of Empagliflozin on cerebral ischemia/reperfusion injury in rat model. *Eur J Mol Clin Med* 7(1): 4324–4334.
21. *Ndefo UA, Anidiobi NO, Basheer E, Eaton AT* (2015) Empagliflozin (Jardiance): A Novel SGLT2 Inhibitor for the Treatment of Type-2 Diabetes. *P T* 40(6): 364–368.
22. *Poppe R, Karbach U, Gambaryan S, Wiesinger H, Lutzenburg M, Kraemer M, Witte OW, Koepsell H* (1997) Expression of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J Neurochem* 69(1): 84–94.  
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69010084.x>
23. *Koepsell H* (2020) Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Arch* 472(9): 1299–1343.  
<https://doi.org/10.1007/s00424-020-02441-x>
24. *Enerson BE, Drewes LR* (2006) The rat blood-brain barrier transcriptome. *J Cereb Blood Flow Metab* 26(7): 959–973.  
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600249>
25. *Nguyen T, Wen S, Gong M, Yuan X, Xu D, Wang C, Jin J, Zhou L* (2020) Dapagliflozin Activates Neurons in the Central Nervous System and Regulates Cardiovascular Activity by Inhibiting SGLT-2 in Mice. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13: 2781–2799.  
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S258593>
26. *Gaur A, Pal GK, Ananthanarayanan PH, Pal P* (2014) Role of Ventromedial hypothalamus in high fat diet induced obesity in male rats: association with lipid profile, thyroid profile and insulin resistance. *Ann Neurosci* 21(3): 104–107.  
<https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.210306>

27. *Al Hamed FA, Elewa H* (2020) Potential Therapeutic Effects of Sodium Glucose-linked Cotransporter 2 Inhibitors in Stroke. *Clin Ther* 42(11): e242–e249.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.09.008>
28. *Kinuthia UM, Wolf A, Langmann T* (2020) Microglia and Inflammatory Responses in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol* 11: 564077.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.564077>
29. *Jackson L, Dumanli S, Johnson MH, Fagan SC, Ergul A* (2020) Microglia knockdown reduces inflammation and preserves cognition in diabetic animals after experimental stroke. *J Neuroinflammation* 17(1): 137.  
<https://doi.org/10.1186/s12974-020-01815-3>
30. *Rizvi SM, Shakil S, Biswas D, Shakil S, Shaikh S, Bagga P, Kamal MA* (2014) Invokana (Canagliflozin) as a dual inhibitor of acetylcholinesterase and sodium glucose co-transporter 2: advancement in Alzheimer's disease- diabetes type 2 linkage via an enzoinformatics study. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13(3): 447–451.  
<https://doi.org/10.2174/18715273113126660160>
31. *Bathina S, Das UN* (2015) Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci* 11(6): 1164–1178.  
<https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342>
32. *Zhen YF, Zhang J, Liu XY, Fang H, Tian LB, Zhou DH, Kosten TR, Zhang XY* (2013) Low BDNF is associated with cognitive deficits in patients with type 2 diabetes. *Psychopharmacology (Berl)* 227(1): 93–100.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-012-2942-3>

### Experimental Study of Sodium–Glucose Cotransporter Type 2 Inhibitors Neuroprotective Effect

A. V. Simanenkova<sup>a, b, \*</sup>, O. S. Fuks<sup>a</sup>, N. V. Timkina<sup>a, b</sup>, T. L. Karonova<sup>a, b</sup>, D. L. Tsyba<sup>c</sup>,  
O. V. Kirik<sup>c</sup>, D. E. Korzhevskii<sup>c</sup>, and T. D. Vlasov<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

<sup>b</sup>Pavlov First Saint-Petersburg State medical university, Saint-Petersburg, Russia

<sup>c</sup>Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

\*e-mail: annasimanenkova@mail.ru

Sodium-glucose cotransporters type 2 inhibitors (SGLT-2i) have proven cardioprotective properties, which makes this class one of the priorities in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus (DM). Ischemic stroke and chronic cerebral dyscirculation occur with a high frequency in DM, which makes it important to study SGLT-2i neurotropic properties. The aim of our study was to evaluate and to compare the neuroprotective effects of highly selective SGLT-2i empagliflozin (EMPA) and low selective SGLT-2i canagliflozin (CANA) and to investigate the probable mechanism of this effect. At the first stage, EMPA and CANA were administered to Wistar rats without DM for 7 days before transient focal 30-minute cerebral ischemia modeling. After 48 h of reperfusion, the neurological deficit was assessed according to the J.H. Garcia scores, then brain sections were incubated in triphenyltetrazolium chloride solution to study brain necrosis volume. The brain damage volume did not differ in “EMPA” and “CANA” groups and was significantly smaller than in the control group - in rats that did not receive any drugs. At the same time, neither EMPA nor CANA had a significant effect on neurological deficit. At the second stage, we modeled type 2 DM (high-fat diet and streptozotocin + nicotinamide), 4 weeks later an 8-week EMPA and CANA therapy was initiated. After the expiration of the therapy period, an immunohistochemical study of the brain tissue was performed. Type 2 DM development was accompanied by an increase in microglia number in the CA1 zone of the hippocampus; treatment with EMPA but not CANA led to the activated microglia number decrease. Thus, highly selective SGLT-2i EMPA and low selective SGLT-2i CANA have a similar infarct-limiting effect when applied for 7 days before ischemia modeling in Wistar rats without DM. The neuroprotective effect of EMPA in DM may be partly due to a decrease in microglial activation.

*Keywords:* diabetes mellitus, neuroprotection, brain ischemia, sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitor, microglia