

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Юбилей

Юбилей академика РАН Юрия Викторовича Наточина 1555

Обзорные и проблемные статьи

- От гипоталамической регуляции гипофизарно-адренокортикальной системы к участию глюкокортикоидных гормонов в гастропротективном действии кортикотропин-релизинг фактора
Л. П. Филаретова, О. Ю. Морозова 1559
- Лактат: новый взгляд на роль эволюционно древнего метаболита
О. П. Шатова, П. В. Шегай, А. А. Заболотнева, А. В. Шестопалов, А. Д. Каприн 1575
- Экспериментальное моделирование повреждающей и протективной гипоксии мозга млекопитающих
Д. Г. Семенов, А. В. Беляков, Е. А. Рыбникова 1592

Экспериментальные статьи

- TGN-020, ингибитор водного канала аквапорина-4, ускоряет процесс нейродегенерации в nigростриатной системе в модели болезни Паркинсона у крыс
К. В. Лапина, Ю. Ю. Абрамова, М. А. Гузев, И. В. Екимова 1610
- Высокоаффинный Kv1.2-селективный пептид
А. М. Гиголаев, Э. Л. Пиньейро-Жуниор, С. Пенъер, Я. Титгат, А. А. Василевский 1627
- Влияние пробиотических штаммов на размер инфаркта миокарда, биохимические и иммунологические параметры у крыс с синдромом системного воспалительного ответа и полиморбидностью
Ю. Ю. Борцев, Д. Л. Сонин, И. Ю. Буровенко, В. Ю. Борцев, Ю. В. Чебуркин, О. В. Борщева, М. М. Галагудза 1639
- Морфологические особенности иннервации эпикардияльной жировой ткани крысы в раннем постнатальном онтогенезе
Е. И. Чумасов, Е. С. Петрова, Д. Э. Коржевский 1655
- Время суток нанесения удара влияет на выраженность немедленных судорог и повышение уровня кортикостерона при моделировании черепно-мозговой травмы
И. Г. Комольцев, С. О. Франкевич, Н. И. Широкова, О. В. Костюнина, А. А. Волкова, Д. А. Башкатова, Д. В. Шальнева, П. А. Кострюков, О. Ю. Салып, М. Р. Новикова, Н. В. Гуляева 1668
- Модуляция сетевой кортикальной активности дыханием у ювенильных анестезированных крыс
В. В. Шумкова, В. Р. Ситдикова, В. М. Силаева, Д. С. Сучков, М. Г. Минлебаев 1680
- Микроэлектростимуляция латеральной орбитальной коры крысы вызывает специфические реакции систем кровообращения и дыхания
Т. Н. Кокурина, Е. А. Губаревич, Г. И. Рыбакова, Т. С. Туманова, В. Г. Александров 1695

Сократительная функция капсулы брыжеечных лимфатических узлов быка
на ранней стадии воспаления

Г. И. Лобов

1706

Методическая статья

Простой регулятор подачи CO₂ для лабораторного инкубатора клеток
из доступных компонентов

М. А. Сулов, Г. В. Сибгатуллина, Д. В. Самигуллин

1725

CONTENTS

Anniversary

Anniversary of Academician Yuri V. Natochin	1555
---	------

Reviews

From Hypothalamic Regulation of Pituitary-Adrenocortical Axis to Participation of Glucocorticoids in Gastroprotective Action of Corticotropin-Releasing Factor <i>L. P. Filaretova and O. Yu. Morozova</i>	1559
Lactate: A New Look at the Role of an Evolutionarily Ancient Metabolite <i>O. P. Shatova, P. V. Shegay, A. A. Zabolotneva, A. V. Shestopalov, and A. D. Kaprin</i>	1575
Experimental Modeling of Damaging and Protective Hypoxia of the Mammalian Brain <i>D. G. Semenov, A. V. Belyakov, and E. A. Rybnikova</i>	1592

Experimental Articles

TGN-020, Inhibitor of the Water Channel Aquaporin-4, Accelerates Nigrostriatal Neurodegeneration in the Rat Model of Parkinson's Disease <i>K. V. Lapshina, Yu. Yu. Abramova, M. A. Guzeev, and I. V. Ekimova</i>	1610
K _v 1.2-Selective Peptide with High Affinity <i>A. M. Gigolaev, E. L. Pinheiro-Junior, S. Peigneur, J. Tytgat, and A. A. Vassilevski</i>	1627
The Effect of Probiotic Strains on Myocardial Infarction Size, Biochemical and Immunological Parameters in Rats with Systemic Inflammatory Response Syndrome and Polymorbidity <i>Yu. Yu. Borshchev, D. L. Sonin, I. Yu. Burovenko, V. Yu. Borshchev, Yu. V. Cheburkin, O. V. Borshcheva, and M. M. Galagudza</i>	1639
Morphological Peculiarities of the Rat Epicardial Fatty Tissue Innervation in Early Postnatal Ontogenesis <i>E. I. Chumasov, E. S. Petrova, and D. E. Korzhevskii</i>	1655
Acute Corticosterone Elevation and Immediate Seizure Expression in Rats Depends on the Time of the Day when Lateral Fluid Percussion Brain Injury Has Been Applied <i>I. G. Komoltsev, S. O. Frankevich, N. I. Shirobokova, O. V. Kostyunina, A. A. Volkova, D. A. Bashkatova, D. V. Shalneva, P. A. Kostrukov, O. Yu. Salyp, M. R. Novikova, and N. V. Gulyaeva</i>	1668
Cortical Network Activity Modulation by Breath in the Anesthetized Juvenile Rats <i>V. V. Shumkova, V. R. Sidikova, V. M. Silaeva, D. S. Suchkov, and M. G. Minlebaev</i>	1680
Microelectrostimulation of the Rat Lateral Orbital Cortex Causes Specific Reactions of the Circulation and Respiration <i>T. H. Kokurina, E. A. Gubarevich, G. I. Rybakova, T. S. Tumanova, and V. G. Aleksandrov</i>	1695
Contractile Function of the Capsule of the Bovine Mesenteric Lymph Nodes at the Early Stage of Inflammation <i>G. I. Lobov</i>	1706

Methodical Articles

Simple CO ₂ Regulator for Laboratory Cell Incubator from Available Components <i>M. A. Suslov, G. V. Sibgatullina, and D. V. Samigullin</i>	1725
---	------

ЮБИЛЕЙ АКАДЕМИКА РАН ЮРИЯ ВИКТОРОВИЧА НАТОЧИНА

DOI: 10.31857/S0869813922120147



В этом году 6 декабря исполняется 90 лет со дня рождения выдающегося ученого в области эволюционной физиологии и физиологии висцеральных систем Юрия Викторовича Наточина. Он родился в 1932 г. в г. Харькове. В годы Великой отечественной войны семья Наточиных вынуждена была эвакуироваться в Сибирь. В Новосибирске Юрий Викторович окончил школу (1950 г.) и Новосибирский государственный медицинский институт, получив диплом врача по специальности “Лечебное дело” (1956 г.). Свое первое исследование “Экспериментальные данные о нейро-гуморальной регуляции желудочной и кишечной секреции у человека” он выполнил под руководством блестящего хирурга, академика АМН С.С. Юдина. Продолжил работу на кафедре физиологии под руководством известного физиолога, чл.-корр. АМН А.Г. Гинецинского. Юрий Викторович всегда вспоминает своих учителей с искренним восхищением. На доклад Ю.В. Наточина “К вопросу о выработке условных рефлексов на введение гормонов” на Всесоюзной студенческой научной конференции в Ленинграде обратил внимание знаменитый фи-

зиолог Л.А. Орбели, который предложил молодому исследователю поступать в аспирантуру. В 1956 г. Юрий Викторович, блестяще сдав экзамены, становится аспирантом Института эволюционной физиологии им. И.М. Сеченова АН СССР (в лаборатории физиологии выделительных процессов у А.Г. Гинецинского), параллельно с аспирантурой получает дополнительное биологическое образование в ЛГУ. Кандидатскую диссертацию о роли гиалуронидазы в функции почки у представителей различных классов позвоночных животных Ю.В. Наточин защитил в 1961 г. в Москве, а уже в 1967 г. получил ученую степень доктора биологических наук, защитив диссертацию на тему “Транспорт воды и натрия в осморегулирующих органах”. В 1972 г. утвержден в ученом звании профессора по специальности “Физиология человека и животных”. Вся научно-исследовательская деятельность юбилера связана с Институтом эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. С 1964 по 2014 г. он возглавлял лабораторию физиологии почки и водно-солевого обмена, в настоящее время является главным научным сотрудником. В 1987 г. он был избран членом-корреспондентом и в 1992 г. — академиком РАН по отделению физиологии. Юрий Викторович много сделал и делает для развития физиологии в нашей стране, способствуя координации исследований, ведущихся в академических учреждениях, вузах и отраслевых институтах. Ю.В. Наточин был членом президиума РАН, академиком-секретарем Отделения физиологии РАН (1996–2002 гг.), и.о. академика-секретаря Отделения физиологии и фундаментальной медицины РАН (2011–2017 гг.), в настоящее время — советник РАН и член Бюро Отделения физиологических наук. В его научной школе выросли академики РАН, руководители институтов и кафедр нашей страны, Болгарии, Венгрии, Таджикистана, Туркмении и др. Им подготовлено более 50 кандидатов и докторов наук.

Ю.В. Наточин — крупнейший ученый в области физиологии висцеральных систем, эволюционной и молекулярной физиологии. С его именем связано развитие фундаментальных и прикладных проблем физиологии почек и водно-солевого обмена в нашей стране. Им проведены исследования функции почек у представителей всех классов позвоночных животных, показано существование систем регуляции для каждого из основных ионов жидкостей внутренней среды. Исследование ионного состава сыворотки крови у осетровых в процессе индивидуального развития, в ходе миграции из Волги в Каспий, в бассейнах Азовского и Черного морей выявило своеобразие физиологической организации системы водно-солевого обмена у русского осетра — изоосмотическую регуляцию. Это имело важное практическое значение — предотвратило реализацию проекта переброски вод Черного моря в Каспийское, что вследствие повышения осмоляльности вод Каспия могло привести к сокращению популяции русского осетра. За цикл работ по эволюции водно-солевого гомеостаза, включающий монографию “Ионорегулирующая функция почки”, Юрий Викторович был удостоен премии им. Л.А. Орбели (1980 г., АН СССР). Без разработок и идей Ю.В. Наточина едва ли были возможны длительное и сверхдлительные космические полеты. В 1963 г. он был приглашен академиком О.Г. Газенко руководить работой по изучению механизмов действия факторов космического полета на водно-электролитный гомеостаз у человека и в 1965 г. опубликовал первую в мире научную статью на эту тему. В 1972 г. он вошел в состав советско-американской рабочей группы по космической биологии (материалы исследований, после снятия грифа секретности, вышли в свет в 1991 г., а в 1998 г. опубликована монография Leach Huntoon C.S., Grigoriev A.I., Natochin Yu.V. Fluid and electrolyte regulation in spaceflight), его работы отмечены орденом “Знак почета” и медалью им. С.П. Королева Федерации космонавтики СССР (1982 г.), премией Правительства РФ в области науки (1997 г.).

Исследования, выполненные под руководством Ю.В. Наточина, вносят большой вклад в понимание природы регуляции водно-солевого обмена: выявлены но-

вые звенья в механизме действия вазопрессина, локусы модуляции эффекта этого гормона в осморегулирующих эпителиях, влияние вазопрессина на транспорт ионов натрия и калия, роль в почке системы местных регуляторных факторов. За совокупность работ по молекулярной физиологии почки Ю.В. Наточину была присуждена Золотая медаль им. И.П. Павлова (2001 г.). В современных работах обоснованы представления о каскадной регуляции функции почек при участии нервной системы, эндокринных желез, аутокоидов и инкретинов, выяснено значение аутокоидов и инкретина глюкагоноподобного пептида-1 при некоторых формах патологии у человека, предложены варианты их коррекции. Ю.В. Наточиным были исследованы особенности действия диуретиков, разработана их физиологическая классификация и схемы эффективного применения при нефропатиях, гломерулонефритах и пиелонефритах, хронической почечной недостаточности, гипоталамических синдромах, гестозах; созданы оригинальные представления о типах диуреза, сформулированы подходы к изучению лекарственных средств с диуретической активностью. Ю.В. Наточин и сотрудница его лаборатории О.А. Гончаревская представляли нашу страну в Комиссии по физиологии почек Международного союза физиологических наук и участвовали в разработке Стандартной номенклатуры структур почки (A standard nomenclature for structures of the kidney, 1988), которая и по настоящее время используется как физиологами и анатомами, так и клиницистами во всем мире. Работы Ю.В. Наточина отличает эволюционная направленность. При изучении водно-солевого обмена и функции почек у различных представителей позвоночных, в процессе индивидуального развития, при деградации функций в условиях патологического процесса были сформулированы закономерности эволюции функций почки, обоснована необходимость их оценки на уровне клетки, функциональных единиц органа, органа и функциональных систем организма. Ю.В. Наточин сформулировал новую гипотезу о роли одновалентных катионов в эволюции жизни, согласно которой жизнь возникла не в море (с доминированием ионов натрия), а в водоемах с преобладанием ионов калия. Совместно с геохимиками обоснована возможность образования калиевых водоемов на Земле и показано, что калиевая среда обеспечивает возможность абиогенного синтеза полипептидов.

Ю.В. Наточин – блестящий педагог и популяризатор науки, лауреат премии Правительства РФ в области образования (2005 г.). Его доклады и лекции – непревзойденная совокупность современной информации, логического анализа и завораживающей манеры изложения. Ю.В. Наточин организовал и возглавил медицинский факультет в СПбГУ (1994–1995 гг. – декан-организатор, 1995–2002 гг. – декан и заведующий кафедрой физиологии, в настоящее время – профессор медицинского факультета СПбГУ, почетный профессор СПбГУ), а в 1998 г. был одним из инициаторов создания малого медицинского факультета для школьников в СПбГДТЮ. По замыслу Ю.В. Наточина медицинский факультет должен был стать местом обучения фундаментальной и клинической медицины, окончив который выпускники получали бы диплом по специальности “Лечебное дело” и имели право осуществлять и научно-исследовательскую, и врачебную деятельность. Ему было очень важно привлечь к созданию и жизни факультета ярких, выдающихся профессоров и преподавателей, чтобы студенты знали, с кого им брать пример и как строить собственную профессиональную жизнь. Сейчас медицинский факультет СПбГУ занимает достойное место среди медицинских вузов страны, его студенты получают широкое гуманитарное и естественнонаучное образование и проходят практику в лучших клиниках города.

Ю.В. Наточин автор и соавтор более 650 научных работ (в т.ч. 11 монографий), им зарегистрирован ряд патентов, опубликованы главы в учебниках и методические пособия. Многие его публикации уникальны не только по сути рассматриваемых

мых проблем, но и по стилю изложения и характеру представления материала. Классической для нескольких поколений нефрологов и физиологов является его брошюра “Физиология почки: формулы и расчеты”. Более 15 лет Юрий Викторович был главным редактором Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова, в разные годы являлся членом редколлегии журналов: Вестник РАН, Успехи физиологических наук, Клиническая нефрология, Renal Failure (США), Comparative of biochemistry and physiology (США), Nephron (Швейцария), Kidney International (США) и т.д. Несомненен талант Ю.В. Наточина как научного редактора переводов иностранных медицинских книг на русский язык. Он широко известен в научном мире, является академиком Европейской академии и Международной астронавтической академии, награжден золотой медалью им. Я. Пуркинье “За выдающийся вклад в биологию и медицину” (АН Чехословакии, 1982), медалью им. С. Рач (Венгрия, 1987).

Нельзя не сказать о тончайшем душевном восприятии юбиляром окружающего мира. Отражение этого мы видим в его выразительном издании “Знаки Времени”, в его замечательных фотографиях, выставка которых прошла недавно в СПбГУ. Фотоаппарат появился в жизни Юрия Викторовича 76 лет назад (настоящий военный трофей – немецкая камера Voigtländer). Он создал прекрасный фотоархив, в котором отражена не только история его семьи, но и нашей страны и мира; собраны портреты выдающихся современников; запечатлены его наблюдения за природой. Серия работ, которая была представлена в 2022 г. на выставке “Магия воды: от реализма до экспрессионизма” в СПбГУ, показывает нам с неожиданной стороны покой и красоту северной столицы – в отражениях в реках и каналах.

Юрия Викторовича отличает доброжелательность, оптимизм, огромная эрудиция, широта и многогранность интересов, неустанный научный поиск, ясность мысли и талант экспериментатора, четкая организованность, высокая требовательность к себе и другим, чувство ответственности за развитие физиологии и науки в России. Мы видим его с горячей душой, огромным сердцем и внимательно изучающими глазами молодого человека. Поздравляем Юрия Викторовича с юбилеем и желаем его видеть таким еще многие годы!

Н.Е. Басова, Г.А. Оганесян, Е.В. Розенгарт, Н.Н. Жерновая
*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

Коллектив Института, редколлегия Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова и Журнала эволюционной биохимии и физиологии присоединяются к поздравлениям и желают Юрию Викторовичу здоровья и дальнейших успехов.

**ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ**

К 85-летию со дня рождения профессора А.А. Филаретова

**ОТ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ
ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ
К УЧАСТИЮ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ ГОРМОНОВ
В ГАСТРОПРОТЕКТИВНОМ ДЕЙСТВИИ
КОРТИКОТРОПИН-РИЛИЗИНГ ФАКТОРА**

© 2022 г. Л. П. Филаретова¹, *, О. Ю. Морозова¹

¹*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*
**E-mail: filaretovalp@infran.ru*

Поступила в редакцию 02.10.2022 г.

После доработки 24.10.2022 г.

Принята к публикации 27.10.2022 г.

Паравентрикулярное ядро гипоталамуса является главным источником кортикотропин-релизинг фактора (КРФ) в портальной системе гипофиза. КРФ играет ключевую роль в стрессорной реакции, активируя гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальную систему (ГГАКС) через каскад событий, кульминацией которых является выделение в кровь глюкокортикоидных гормонов. Несколько механизмов принимают участие в контроле активации ГГАКС, включая торможение системы по механизму обратной связи, который рассматривается как важный механизм регуляции продукции глюкокортикоидных гормонов. Помимо адаптивных физиологических реакций, в ответ на стресс могут развиваться и патологические соматические и психические нарушения, в том числе, поражение слизистой оболочки желудка, эрозии и язвы. При стрессе активируются как ulcerогенные, так и защитные механизмы слизистой оболочки желудка. Обзор нацелен на то, чтобы показать, как эндокринологический подход к решению гастроэнтерологических проблем способствовал выяснению роли ГГАКС в регуляции поддержания целостности слизистой оболочки желудка и привел к новым знаниям. Наши результаты о роли паравентрикулярного ядра гипоталамуса в активации ГГАКС и торможении системы по механизму обратной связи проложили путь к экспериментальным исследованиям, в ходе которых было установлено, что активация ГГАКС является гастропротективным компонентом стрессорной реакции, а глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на стресс, действуют как гастропротективные, а не как ulcerогенные факторы, как это было общепринято. Эти данные позволили предположить, что глюкокортикоидные гормоны могут участвовать и в обеспечении гастропротективного действия КРФ. Полученные результаты подтвердили, что экзогенный КРФ может защищать слизистую оболочку желудка от стресс-индуцированного, а также индометацин-индуцированного повреждения за счет вовлечения глюкокортикоидных гормонов. Вместе эти данные являются убедительным аргументом в пользу гастропротективной роли активации ГГАКС.

Ключевые слова: паравентрикулярное ядро гипоталамуса, гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система, стресс, кортикотропин-релизинг фактор, глюкокортикоидные гормоны, гастропротекция

DOI: 10.31857/S0869813922120044

В конце 70-х годов XX столетия, когда начинались наши научные исследования, о результатах которых пойдет речь в настоящем обзоре, еще не была расшифрована структура кортикотропин-рилизинг фактора (КРФ). В связи с этим оставался не решенным вопрос о локализации в гипоталамусе КРФ – “первого медиатора стресса”, стимулирующего активацию гипофизарно-адренокортикальной системы (ГАКС) при стрессе, существование которого пророчески предсказал Ганс Селье [1].

В научной литературе того времени, посвященной гипоталамической регуляции ГАКС, дебатировался вопрос о том, является ли гипоталамическим центром, ответственным за стрессорную активацию данной системы и соответственно местом локализации КРФ-продуцирующих нейронов, медиобазальный гипоталамус или паравентрикулярное ядро гипоталамуса [2–4]. До выяснения структуры КРФ вопрос, главным образом, выяснялся путем разрушения или стимуляции гипоталамических ядер [5–7].

Расшифровкой структуры КРФ активно занялся ученик Селье Guillemin, который на пути этого поиска расшифровал структуру других гипоталамических рилизинг факторов (тиреотропин-рилизинг гормона и гонадотропин-рилизинг гормона), за что в 1977 г. вместе с Schally получил Нобелевскую премию [8, 9]. Структура КРФ была расшифрована в 1981 г. Vale [10]. КРФ оказался пептидом, включающим 41 аминокислотный остаток [11], который, как и предполагал Селье, стимулировал продукцию гипофизарного адренокортикотропного гормона (АКТГ) или кортикотропина и через АКТГ – синтез и секрецию глюкокортикоидных гормонов корой надпочечников [12, 13]. Позднее было выяснено, что КРФ взаимодействует с двумя типами КРФ-рецепторов: КРФ-рецепторами 1-го и 2-го типов (КРФ1- и КРФ2-рецепторами соответственно), которые кодируются двумя различными генами [14, 15]. Расшифровка структуры КРФ, клонирование КРФ1- и КРФ2-рецепторов [16], разработка их селективных антагонистов и агонистов [17, 18] открыли возможности для выяснения многих актуальных вопросов, ключевым из которых изначально являлся вопрос о гипоталамической локализации КРФ-продуцирующих нейронов. Использование этих новых возможностей убедительно доказало, что местом локализации КРФ-продуцирующих нейронов является паравентрикулярное ядро гипоталамуса [19, 20]. Было выяснено, что КРФ1-рецепторы, находящиеся на кортикотрофах гипофиза, опосредуют КРФ-индуцированную активацию ГАКС [12, 13].

Появление в арсенале исследователей агонистов и антагонистов КРФ-рецепторов позволило выявить широкое вовлечение КРФ сигнальных путей в регуляцию физиологических функций и в их интеграцию, а также в развитие патологических процессов в организме [15, 21–24]. Ключевым и активно развивающимся и в настоящее время направлением этих исследований является изучение вовлечения КРФ сигнальных путей в реализацию физиологических и патологических влияний стресса. Весомый вклад в развитие этого направления, и особенно в изучение участия КРФ сигнальных путей в реализации стрессорных влияний на желудочно-кишечный тракт, внесла ученица Селье Tache [25].

Среди превалирующих в литературе данных о вкладе КРФ в патологические эффекты стресса на желудочно-кишечный тракт имеется небольшое число работ, демонстрирующих возможность и позитивных, физиологических влияний экзогенного КРФ на желудок (гастропротективных влияний) [26–28]. Поскольку КРФ стимулирует активность ГАКС, приводя к повышению продукции глюкокортикоидных гормонов, то естественным было предположить вовлечение этих гормонов в опосредование выявленного гастропротективного действия экзогенного КРФ. Была предпринята попытка проверить такое предположение экспериментально на адреналэктомированных крысах, однако, полученные при этом результаты не позволили авторам сделать заключение о вовлечении глюкокортикоидных гормонов в гастропротективное действие КРФ [27], на этом проверка предположения и оста-

новилась. Отсутствие должного интереса к изучению вопроса об участии глюкокортикоидных гормонов в реализации гастропротективного действия КРФ мы объясняем традиционной в то время точкой зрения об ulcerогенном (а не гастропротективным) действии глюкокортикоидных гормонов вообще, и в частности глюкокортикоидов, продуцирующихся при стрессе [29, 30]. Результаты наших многолетних исследований, начатых в конце 80-х годов XX века, позволили пересмотреть эту общепринятую в течение нескольких десятилетий точку зрения и доказать возможность гастропротективного действия глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся при стрессе [31–41]. Эти новые знания явились для нас убедительным основанием продолжить изучение вопроса об участии глюкокортикоидных гормонов в опосредовании гастропротективного действия КРФ. Полученные при этом результаты позволили заключить, что глюкокортикоидные гормоны принимают участие в реализации гастропротективного действия КРФ [42–46].

Цель настоящего обзора – на основании полученных нами результатов с учетом имеющихся данных литературы показать наш путь исследований от гипоталамической регуляции ГАКС к участию глюкокортикоидных гормонов в гастропротективном действии КРФ. В обзоре мы раскроем основные вехи этого пути, кратко обозначенные во введении.

ГИПОТАЛАМИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Выдающаяся заслуга Селье, признававшего открытую Кенноном роль катехоламинов в обеспечении неспецифических ответов организма на чрезвычайные воздействия, состоит в открытии ключевой роли ГАКС в обеспечении этих ответов, названных им стрессом. Селье экспериментально доказал вовлечение переднего гипофиза в механизмы, ответственные за стимуляцию коры надпочечников и продукцию глюкокортикоидных гормонов при стрессе [47]. Помимо терминов “стресс” и “стрессор”, термины “кортикоиды”, “глюкокортикоиды” и “минералокортикоиды” также были введены Селье [48]. Более того, именно Селье открыл противовоспалительные свойства глюкокортикоидных гормонов и провоспалительные свойства минералокортикоидов, что является малоизвестным фактом [49].

Адекватные реакции ГАКС на стрессорные воздействия возможны благодаря контролю со стороны центральной нервной системы. Этому пониманию способствовала постановка Селье в 50-е годы прошлого века вопроса о “первом медиаторе стресса” – некоей субстанции нейронального происхождения, достигающей гипофиза и стимулирующей секрецию АКТГ [1]. Изучению проблемы центральной регуляции ГАКС уделялось внимание с 60-х годов прошлого столетия. Результаты исследований 60–70-х годов свидетельствовали об участии гиппокампа, миндалевидного комплекса, лимбической коры, ретикулярной формации ствола мозга в регуляции ГАКС [7]. При этом среди структур головного мозга, участвующих в центральной регуляции ГАКС, особо выделялся гипоталамус, поскольку именно здесь предполагалась локализация КРФ-продуцирующих нейронов, активация и торможение которых зависят от афферентной импульсации, поступающей к ним. Благодаря этой сигнализации обеспечиваются реакции ГАКС, адекватные сложившейся ситуации. Достаточно долго было общепринято, что ключевой областью гипоталамуса, ответственной за активацию ГАКС, является медиобазальный гипоталамус, и именно здесь локализованы КРФ-продуцирующие нейроны [2, 4, 7]. При этом до выяснения структуры КРФ заключения, главным образом, делались на основании результатов исследований, проводимых с использованием разрушения или стимуляции гипоталамических ядер [5, 7, 50], а также с регистрацией их электрической активности [51]. Конец 70-х–начало 80-х годов прошлого века – это

время, когда на смену прежней концепции о локализации КРФ-продуцирующих нейронов в медиобазальном гипоталамусе пришла новая, согласно которой такие нейроны скорее расположены вне медиобазального гипоталамуса, возможно, в паравентрикулярном ядре гипоталамуса.

Как раз в это время, в 1979 г., после окончания университета мы (первый автор этой статьи Л.П. Филаретова) подключились к исследованиям центральной регуляции ГАКС, проводимым в лаборатории экспериментальной эндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН Анатолием Аркадьевичем Филаретовым и сотрудниками возглавляемой им группы [50, 51]. В 1979 г. А.А. Филаретов подытожил результаты своих предыдущих экспериментальных исследований в докторской диссертации “Гипоталамическая регуляция гипофизарно-адренкортикальной системы” и монографии “Нервная регуляция гипофизарно-адренкортикальной системы” [7]. Появление этой монографии, в которой эндокринологические вопросы были представлены в аспекте нейрофизиологии, Анатолий Аркадьевич объяснил желанием обратить внимание на нейрофизиологическую сторону эндокринологии. Монография базируется на данных автора об афферентной импульсации гипоталамуса и активности ГАКС, о роли центральной нервной системы в обеспечении стрессорной активации ГАКС, о механизмах обратной связи в регуляции ГАКС.

В рамках развития направления исследований А.А. Филаретова в нашей совместной работе мы сфокусировали внимание на вопросе о сравнительной роли паравентрикулярного ядра гипоталамуса и вентромедиального ядра медиобазального гипоталамуса в обеспечении активации и торможения ГАКС. Выбор этих гипоталамических ядер определялся тем, что паравентрикулярное ядро только начали рассматривать как возможное место локализации КРФ-продуцирующих нейронов, а вовлечение медиобазального гипоталамуса в регуляцию ГАКС уже было продемонстрировано в исследованиях А.А. Филаретова [7]. Естественно, что роль паравентрикулярного ядра в активации и торможении ГАКС представляла для нас первостепенный интерес, поскольку к началу наших исследований оставалась неизвестной.

Роль паравентрикулярного и вентромедиального ядра гипоталамуса в активации и торможении ГАКС мы изучали в хронических экспериментах на кроликах путем двустороннего разрушения этих ядер, а также регистрации их электрической активности. Состояние ГАКС оценивали по уровню глюкокортикоидных гормонов в плазме крови. В качестве стрессорного воздействия, активирующего ГАКС, использовали иммобилизацию в течение 1 ч. О торможении ГАКС судили на основании угнетения стрессорного гормонального ответа после введения кортизола. Угнетение стрессорного подъема уровня глюкокортикоидов в крови экзогенным гормоном, введенным до начала стрессорного воздействия, – наиболее распространенная модель экспериментов для исследования торможения ГАКС по механизму обратной связи [52]. Эксперименты начинали не ранее, чем через две недели после разрушения ядер или вживления электродов.

Результаты проведенных нами экспериментов показали, что у кроликов с разрушенным паравентрикулярным ядром стрессорная реакция на иммобилизацию выражена значительно слабее и наступает позднее по сравнению с таковой у животных с интактным мозгом (рис. 1а), [53, 54].

Полученные результаты свидетельствуют об участии паравентрикулярного ядра в стрессорной активации ГАКС и существенно дополняют данные других авторов, которые опередили нас по публикациям статей [3, 55, 56]. Их данные были получены на крысах и в экспериментах, проведенных достаточно рано после разрушения паравентрикулярного ядра. Для уменьшения влияния непосредственно самого хирургического воздействия, наши эксперименты проводились в более отдаленные

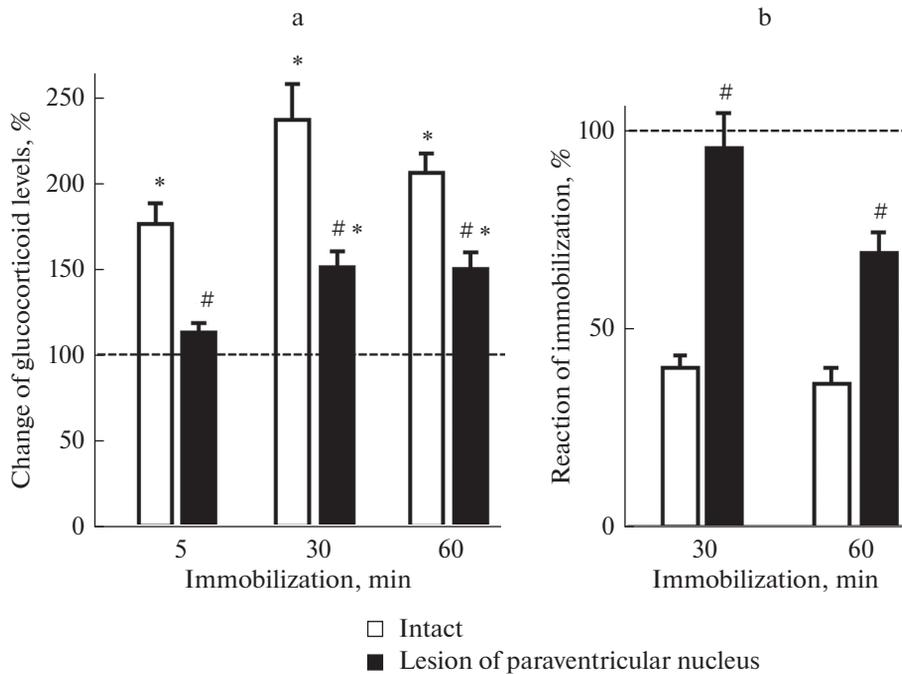


Рис. 1. Влияние разрушения паравентрикулярного ядра гипоталамуса на стресс-индуцированную активацию гипофизарно-адренокортикальной системы (а) и ее торможение по механизму обратной связи после введения кортизола (б) у кроликов. Стрессор – иммобилизация. На (а) – стресс-индуцированный уровень глюкокортикоидных гормонов в плазме крови по отношению к базальному, принятому за 100%; (б) стресс-индуцированный уровень глюкокортикоидных гормонов в плазме крови после введения кортизола по отношению к стресс-индуцированному уровню глюкокортикоидов у контрольных животных без введения кортизола, принятому за 100%. Обозначения: (а, б) intact – интактные животные, lesion of paraventricular nucleus – животные с разрушением паравентрикулярного ядра. Данные представлены как *mean* ± *SE*, количество случаев 12–36. Статистически значимые отличия при $p < 0.05$; * от 100%, # от интактных (intact).

сроки после разрушения ядер. К важному дополнению относится также выявленное нами не только уменьшение амплитуды стрессорного ответа после разрушения паравентрикулярного ядра, но и существенная задержка в его проявлении (рис. 1а) [53]. Результаты всех работ, выполненных с разрушением паравентрикулярного ядра гипоталамуса [3, 53, 55, 56], убедительно поддержали его важную роль в обеспечении стрессорной активации ГАКС. При этом хочется обратить внимание на работы проф. Gabor Makara из Института экспериментальной медицины в Будапеште [2, 3, 5], за исследованиями которого мы наблюдали в то время с особым интересом, поскольку признавали его лидерскую позицию в направлении этих исследований регуляции ГАКС с использованием разрушения и деафферентации гипоталамических ядер, не зная еще тогда, что впереди (начиная с 1993 г.) нас ожидает многолетнее успешное сотрудничество.

В унисон заключению о важной роли паравентрикулярного ядра в активации ГАКС, сделанному на основании работ с его разрушением, прозвучали и результаты наших исследований по регистрации электрической активности паравентрикулярного ядра при стрессорной иммобилизации кроликов. Согласно этим результа-

там при активации ГАКС происходит увеличение частоты разрядов нейронов паравентрикулярного ядра по сравнению с фоновой (до стресса). При этом увеличение частоты импульсов нейронов сопровождалось стрессорным повышением содержания глюкокортикоидных гормонов в крови [57]. До нашей работы электрическая активность паравентрикулярного ядра в связи с активностью ГАКС не изучалась.

Таким образом, результаты наших экспериментов с использованием двух подходов (не только разрушения паравентрикулярного ядра гипоталамуса, но и регистрации его нейрональной активности) убедительно свидетельствуют об участии паравентрикулярного ядра гипоталамуса в активации ГАКС.

Особое значение в исследованиях А.А. Филаретова, в том числе и наших совместных, придавалось изучению механизмов и закономерностей торможения ГАКС в силу его важности для регуляции [7, 58–60]. Накоплено много доказательств, что в паравентрикулярном ядре гипоталамуса замыкаются механизмы обратной связи [61–63]. Известно, что гормоны ГАКС (АКТГ и глюкокортикоидные гормоны) ингибируют продукцию КРФ в паравентрикулярном ядре гипоталамуса за счет включения механизмов обратной связи, что является важным звеном регуляции ГАКС, обеспечивающим ее восстановление после стрессорной активации [64]. Глюкокортикоидные гормоны ингибируют как продукцию КРФ в паравентрикулярном ядре гипоталамуса, так и продукцию АКТГ в гипофизе. Известно, что КРФ-продуцирующие нейроны паравентрикулярного ядра гипоталамуса экспрессируют глюкокортикоидные рецепторы, и глюкокортикоиды способны регулировать уровни транскрипции и экспрессии гена КРФ непосредственно в паравентрикулярном ядре [65]. К настоящему времени успех в выяснении регуляции ГАКС за счет торможения ее активности через механизмы обратной связи, а также через другие механизмы достигнут огромный [66–68]. Однако в конце 70-х годов прошлого века не только тонкие механизмы торможения ГАКС, но и гипоталамические ядра, вовлекающиеся в эти механизмы, оставались еще не известными.

Вот почему параллельно с изучением роли паравентрикулярного ядра в активации ГАКС мы выясняли его роль и в торможении системы по механизму обратной связи, используя те же подходы: разрушение ядра и регистрацию его электрической активности. Роль паравентрикулярного ядра в торможении ГАКС определялась путем сопоставления ингибирования стрессорной реакции ГАКС (на иммобилизацию в течение 1 ч) у интактных кроликов и животных с разрушенным паравентрикулярным ядром. Для торможения стрессорной активации ГАКС кроликам перед началом иммобилизации вводили кортизол в дозе (100 мкг/кг), которая была подобрана на основании результатов предварительного исследования. Как и следовало ожидать, у контрольных животных экзогенный кортизол по механизму отрицательной обратной связи вызывал ярко выраженное ингибирование стрессорного ответа ГАКС. В то же время разрушение паравентрикулярного ядра приводило к значительному уменьшению степени торможения ответа кортизолом, при этом на тридцатой минуте иммобилизации ингибирования стрессорной реакции ГАКС вообще не наблюдалось (рис. 1б) [53, 69]. Полученные результаты убедительно доказали участие паравентрикулярного ядра гипоталамуса в обеспечении торможения ГАКС по механизму обратной связи. В этом мы оказались первыми и по публикациям [53, 69]. Более того, нам удалось получить убедительное подтверждение этого факта и в экспериментах с регистрацией электрической активности паравентрикулярного ядра. Во время иммобилизации на фоне введенного кортизола (в условиях угнетения ГАКС) не только не наблюдалось увеличения частоты импульсов нейронов выше фоновой, но даже происходило ее значимое уменьшение ниже исходной [57].

Таким образом, результаты наших исследований с регистрацией электрической активности подтверждают данные, полученные в условиях разрушения паравентрикулярного ядра, о том, что это ядро участвует в обеспечении как активации, так

и торможения ГАКС. Эти данные позволили предположить, что активация нейронов паравентрикулярного ядра (возможно, КРФ-продуцирующих нейронов) обеспечивает возбуждение, а торможение этих нейронов – угнетение функции ГАКС. Для того чтобы выяснить, играет ли паравентрикулярное ядро доминирующую роль в регуляции ГАКС, мы сравнивали ее с ролью вентромедиального ядра медиобазального гипоталамуса в тех же экспериментальных условиях.

Результаты наших экспериментов с разрушением вентромедиального ядра гипоталамуса показали и его участие как в активации, так и в торможении ГАКС. При этом в отношении активации ГАКС мы подтвердили ранее полученные результаты, в том числе и А.А. Филаретова [7], а в отношении торможения ГАКС наши данные привнесли еще и существенный элемент новизны. Мы впервые показали участие вентромедиального ядра в торможении ГАКС при использовании физиологических доз естественных глюкокортикоидных гормонов [53].

Для сравнительной оценки роли паравентрикулярного ядра и вентромедиального ядра гипоталамуса в регуляции ГАКС сравнивали влияние разрушения каждого из этих ядер на стрессорную активацию ГАКС, а также на торможение стрессорной реакции ГАКС по механизму обратной связи. Главная новизна наших результатов, полученных при этом, заключается в том, что разрушение паравентрикулярного ядра вызывает большее угнетение как активации, так и торможения ГАКС по механизму обратной связи, чем разрушение вентромедиального ядра. Полученные данные свидетельствуют о том, что паравентрикулярное ядро гипоталамуса вносит больший вклад как в активацию, так и торможение ГАКС по сравнению с вентромедиальным ядром [53].

Следующий вопрос, который мы поставили, – как обеспечивается активация ГАКС этими ядрами, имеют ли эти ядра независимый друг от друга выход или нет, иными словами, соединены они параллельно или последовательно. Для выяснения этого вопроса мы сравнивали эффект разрушения обоих ядер на активацию ГАКС с эффектом разрушения только паравентрикулярного ядра, которое, как мы выяснили, вызывает наибольшее угнетение стрессорной реакции. Согласно полученным данным, разрушение двух ядер (паравентрикулярного и вентромедиального) не приводит к большему снижению стрессорной активности ГАКС по сравнению с разрушением только паравентрикулярного ядра [53]. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что паравентрикулярное и вентромедиальное ядра гипоталамуса соединены последовательно при активации ГАКС. Данные литературы, полученные на крысах с деафферентацией медиобазального гипоталамуса, также свидетельствуют в пользу такого заключения [70].

Таким образом, около 40 лет назад на основании полученных экспериментальных данных, в том числе и наших, стало очевидно, что главным регулятором продукции глюкокортикоидов, гормонов конечного звена ГГАКС, является паравентрикулярное ядро гипоталамуса, именно здесь локализованы КРФ-продуцирующие нейроны. Реализуя эту функцию, паравентрикулярное ядро суммирует разнообразную информацию, поступающую как из внешних, так и из внутренних источников, в секреторный сигнал к коре надпочечников [71], благодаря чему обеспечиваются реакции ГАКС, адекватные сложившейся ситуации. За последние 40 лет был пройден путь от выяснения основного гипоталамического источника КРФ-продуцирующих нейронов до тонких механизмов, лежащих в основе регуляции ГАКС [67, 68]. По понятной причине к названию гипофизарно-адренкортикальная система добавился гипоталамический уровень, в результате начали использовать новое название – гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система (ГГКАС), к нему мы и переходим.

Важный вклад в понимание функционирования ГГКАС вносят работы А.А. Филаретова о принципах и закономерностях функционирования ГГКАС, определяю-

щих адаптационные возможности организма [72, 73], о функциональном значении многозвеньевое построения гипоталамо-гипофизарно нейроэндокринных систем [73]. А.А. Филаретов выдвинул и обосновал (на примере ГГАКС) концепцию о значении и преимуществах построения нейроэндокринных систем из трех эфферентных гормональных звеньев [73]. Преимущества нейроэндокринной системы, построенной из трех гормональных звеньев, А.А. Филаретов видел в том, что: 1) система работает как биохимический усилитель (усиление сигнала в 100 тысяч раз по массе гормона); 2) система имеет несколько контуров регуляции; 3) обладает возможностью использования гормонов каждого звена для управления не только данной системой, но и другими функциями организма [73].

К вопросу “возможности использования гормонов каждого звена (КРФ и глюкокортикоидов) для управления не только данной системой, но и другими функциями организма”, мы обратимся в следующей главе.

УЧАСТИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ ГОРМОНОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ГАСТРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ КОРТИКОТРОПИН-РИЛИЗИНГ ФАКТОРА

Роль КРФ не ограничивается исключительно нейроэндокринной регуляцией ГГАКС [14]. КРФ – важный медиатор физиологических и патофизиологических процессов в центральной нервной системе, сердечно-сосудистой, иммунной, репродуктивной и пищеварительной системах [15]. Значительный прогресс достигнут в понимании вклада КРФ сигнальных путей в патологические эффекты стресса на желудочно-кишечный тракт [14, 25]. Среди большого количества публикаций о вкладе КРФ в механизмы патологического влияния стресса на желудочно-кишечный тракт совсем немного работ, демонстрирующих физиологическое действие КРФ на желудок. Это работы о гастропротективном действии КРФ, опубликованные в первой половине 90-х годов прошлого века [26–28, 74, 75]. Годы этих публикаций свидетельствуют об угасании интереса к этим физиологическим эффектам.

В ходе анализа литературы мы обнаружили, что не только механизмы, но и сам по себе гастропротективный эффект КРФ изучен недостаточно. Гастропротективное действие КРФ было выявлено у крыс только в стрессорных ulcerогенных моделях: иммобилизации в условиях холода в течение 3–4 ч [26, 28, 75] и иммобилизации в условиях погружения в охлажденную воду в течение 2–4 ч [27, 74]. При этом гастропротективное действие КРФ было продемонстрировано при его центральном введении. Данные литературы о гастропротективном действии КРФ при его периферическом введении противоречивы [27, 74]. Это обстоятельство определило наш выбор в отношении использования внутрибрюшинного введения КРФ. Результаты наших исследований на крысах убедительно демонстрируют возможность проявления гастропротективного действия КРФ при его периферическом введении, причем как в стрессорной ulcerогенной модели (иммобилизации в условиях холода в течение 3 ч) [42, 43, 76], так и в индометациновой ulcerогенной модели, а также и при ишемии–реперфузии желудка [42]. В нашей работе периферическое введение КРФ приводило к уменьшению эрозивных повреждений слизистой оболочки желудка при введении в малых дозах: 1.25 или 2.5 мкг/кг [42, 43]. Введение КРФ в этих дозах не только оказывало гастропротективное влияние, но и приводило к повышению уровня кортикостерона в крови у крыс. Эти результаты свидетельствовали в пользу возможности вклада глюкокортикоидных гормонов в обеспечение гастропротективного действия КРФ.

Сделать такое предположение было для нас естественным еще и потому, что в это время мы имели убедительные собственные доказательства гастропротективного действия глюкокортикоидных гормонов, продуцирующихся в ответ на острое

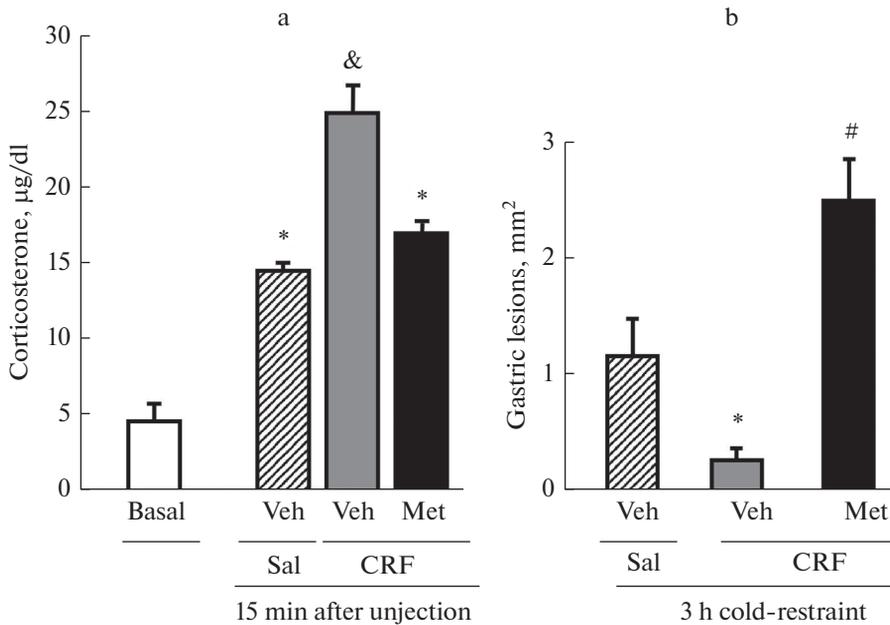


Рис. 2. Влияние метирапона на КРФ-индуцированное повышение уровня кортикостерона в крови (а) и защитный эффект КРФ от повреждений слизистой оболочки желудка, индуцированных трехчасовой иммобилизацией в условиях холода (б) у крыс. Обозначения: (а) Basal – базальный, Met (Metirapone) – метирапон, Veh (Vehicle) – растворитель метирапона, CRF – КРФ, Sal (Saline) – физиологический раствор (растворитель КРФ); (б) 3 h cold-restraint – трехчасовая иммобилизация в условиях холода, остальные как на (а). Данные представлены как *mean* ± *SE*, количество случаев 7–8. Статистически значимые отличия при $p < 0.05$; (а) * от Basal, & от всех групп (б) * от Veh & Sal, # от всех групп.

стрессорное воздействие [31, 32, 41, 33–40]. Эти результаты явились для нас убедительным основанием продолжить изучение вопроса об участии глюкокортикоидных гормонов в опосредовании гастропротективного действия КРФ.

Для проверки этого предположения мы использовали два подхода, направленных: 1) на ингибирование продукции кортикостерона, продуцирующегося в ответ на введение КРФ метирапоном и 2) на блокаду глюкокортикоидных рецепторов. Предварительное введение метирапона предотвращало индуцированное КРФ повышение уровня кортикостерона в крови (рис. 2а) и приводило к отмене гастропротективного действия КРФ в условиях ulcerогенной стрессорной модели у крыс (рис. 2б) [42, 43]. Более того, в этих условиях наблюдалось усугубление ulcerогенного действия стрессора (рис. 2б).

Блокада глюкокортикоидных рецепторов их антагонистом RU-38486 также сопровождалась предотвращением гастропротективного действия КРФ в стрессорной модели [43]. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными нами в условиях индометациновой ulcerогенной модели и вместе свидетельствуют о вовлечении глюкокортикоидных гормонов в гастропротективное действие КРФ в стрессорной и индометациновой ulcerогенных моделях у бодрствующих крыс. Поскольку, как известно, активирующее влияние КРФ на ГАКС осуществляется через КРФ1-рецепторы [12, 13], то это свидетельствует о вовлечении КРФ1 сигнального пути в гастропротективное действие КРФ в этих условиях.

В ulcerогенной модели ишемии–реперфузии у наркотизированных крыс мы не смогли сделать такие же заключения о механизмах, опосредующих гастропротективное действие КРФ, поскольку введение метирапона не влияло на гастропротективное действие КРФ в этом случае [42]. Вместе с тем гастропротективное действие КРФ в модели ишемии–реперфузии устранялось после введения неспецифического антагониста КРФ–рецепторов адрессина и специфического антагониста КРФ₂-рецепторов адрессина₂-Б, что свидетельствует о вовлечении КРФ₂ сигнального пути в обеспечение гастропротекции в этих условиях [42].

Полученные в работе результаты свидетельствуют о возможности вовлечения в реализацию гастропротективного действия КРФ как глюкокортикоидных гормонов и КРФ₁-рецепторов, так и КРФ₂-рецепторов. Вопрос о вкладе КРФ₁ и КРФ₂ сигнальных путей в гастропротективное действие КРФ ранее не исследовался. Выяснение причин, которыми может быть обусловлено преобладание участия того или иного сигнального пути в обеспечении гастропротективного действия КРФ, а также исследование возможного взаимодействия этих сигнальных путей важно не только для понимания механизмов гастропротективного действия КРФ, но также и для более глубокого понимания механизмов регуляции ГГАС. В дополнение к тому, что КРФ₁ сигнальный путь признается основным в активации ГГАС, имеются факты, свидетельствующие о вкладе КРФ₂ сигнального пути в ингибирование ГГАС [13]. Тем не менее, вопрос о взаимодействии КРФ₁ и КРФ₂ сигнальных путей в регуляции ГГАС при стрессе остается малоизученным и требует дальнейших исследований. Значимость этих исследований определяется той важнейшей ролью, которая принадлежит КРФ в интеграции функционирования различных систем организма при стрессе [77, 78].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии глюкокортикоидных гормонов в реализации гастропротективного действия экзогенного КРФ [42–46].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вспоминая А.А. Филаретова, хочется повторить его слова, которыми он вспоминал своего учителя Д.Г. Квасова: “Ближайший ученик А.А. Ухтомского, физиолог огромной эрудиции, экспериментатор и теоретик, Дмитрий Григорьевич (Квасов) был самым ярким человеком, встретившимся мне, он навсегда стал образцом Ученого и определил мои дальнейшие научные интересы”. Даром судьбы для каждого начинающего путь в науке, несомненно, является встреча с научным руководителем – Ученым. Мы благодарны судьбе, что такой дар у нас был, что была возможность пройти настоящую научную школу, ненавязчивую, с принципом воспитания собственным примером увлеченности наукой, научной честности и принципиальности, с высокой “планкой” и проверкой полученных результатов публикациями в известных международных журналах.

Как настоящий ученый, Анатолий Аркадьевич видел новые важные перспективы для исследований и обладал поразительной способностью обобщать научные факты до уровня серьезных концепций [7, 72, 79].

А.А. Филаретов был открыт новым идеям и своих учеников, и если принимал их и давал “добро” на их развитие, то всячески поддерживал и активно участвовал в этом развитии. Так случилось с совершенно новым для эндокринологической лаборатории направлением исследований о влиянии глюкокортикоидных гормонов на слизистую оболочку желудка и с выяснением принципиально важного вопроса: действительно ли глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся при стрессе, являются ulcerогенными гормонами, как это было общепринято в течение почти четырех десятилетий.

В обзоре мы старались продемонстрировать, как эндокринологический подход к решению гастроэнтерологических проблем способствовал выяснению роли ГГАС в регуляции поддержания целостности слизистой оболочки желудка и привел к новым знаниям. Наши результаты о роли паравентрикулярного ядра гипоталамуса в активации ГГАС и, особенно, торможении системы по механизму обратной связи проложили путь к экспериментальным исследованиям, в ходе которых было установлено, что активация ГГАС является гастропротективным компонентом стрессорной реакции, а глюкокортикоидные гормоны, продуцирующиеся в ответ на стресс, действуют как гастропротективные, а не как ulcerогенные факторы, как это было общепринято. Эти данные позволили предположить, что глюкокортикоидные гормоны могут участвовать и в обеспечении гастропротективного действия КРФ. Полученные результаты подтвердили, что экзогенный КРФ может защищать слизистую оболочку желудка от стресс-индуцированного, а также индометацин-индуцированного повреждения за счет вовлечения глюкокортикоидных гормонов. Вместе эти данные являются убедительным аргументом в пользу гастропротективной роли активации ГГАС.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта НЦМУ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020) Павловский центр “Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Написание и редактирование рукописи (Л.П.Ф.), работа с литературой и рисунками (О.Ю.М.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории экспериментальной эндокринологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, которые работали под руководством Анатолия Аркадьевича Филаретова, продолжали участие в развитии направлений исследований, которым посвящен обзор: Багаевой Татьяне Ростиславовне, Подвижной Татьяне Трофимовне, Ярушкиной Наталье Ильиничне, Колбасовой Татьяне Ивановне, Никифоровой Альбине Михайловне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Selye H* (1976) Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J* 115: 53–56.
2. *Makara GB, Stark E, Kártész M, Fellinger E, Rappay G, Szabó D* (1980) Effect of electrical stimulation of the neurohypophysis on ACTH release in rats with hypothalamic lesions. *Neuroendocrinology* 31: 237–243. <https://doi.org/10.1159/000123081>
3. *Makara GB, Stark E, Kártész M* (1981) Effects of paraventricular lesions on stimulated ACTH release and CRF in stalk-median eminence of the rat. *Am J Physiol* 240: 441–446. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1981.240.4.E441>
4. *Szenhágóthai J, Flerkó B, Mess B, Halász K* (1968) Hypothalamic control of the anterior pituitary. Budapest. Akadémiai kiadó.
5. *Makara GB, Antoni FA, Stark E* (1982) Electrical stimulation in the rat of the supraoptic nucleus: failure to alter plasma corticosterone after surgical lesioning of the paraventricular nucleus.

- Neurosci Lett 30: 269–273.
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90411-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90411-6)
6. *Bruhn TO, Plotsky PM, Valet WW* (1984) Effect of paraventricular lesions on corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the stalk-median eminence: studies on the adrenocorticotropin response to ether stress and exogenous CRF. *Endocrinology* 114: 57–62.
<https://doi.org/10.1210/ENDO-114-1-57>
 7. *Филаретов АА* (1979) Нервная регуляция гипофизарно-адренкортикальной системы. Л. Наука. [*Filaretov AA* (1979) Nervous regulation of the pituitary-adrenocortical system. L. Nauka. (In Russ)].
 8. *Raju TN* (2000) The Nobel chronicles. 1999: Günter Blobel (b 1936). *Lancet* (London, England) 356: 436.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)73589-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)73589-3)
 9. *Taché Y, Brunhuber S* (2008) From Hans Selye’s discovery of biological stress to the identification of corticotropin-releasing factor signaling pathways: implication in stress-related functional bowel diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1148: 29–41.
<https://doi.org/10.1196/ANNALS.1410.007>
 10. *Bittencourt JC* (2013) The tale of a person and a peptide: Wylie W. Vale Jr. and the role of corticotropin-releasing factor in the stress response. *J Chem Neuroanat* 54: 1–4.
<https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2013.04.005>
 11. *Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J* (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213: 1394–1397.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6267699>
 12. *Bale TL, Vale WW* (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 525–557.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.44.101802.121410>
 13. *Rivier CL, Grigoriadis DE, Rivier JE* (2003) Role of corticotropin-releasing factor receptors type 1 and 2 in modulating the rat adrenocorticotropin response to stressors. *Endocrinology* 144: 2396–2403.
<https://doi.org/10.1210/en.2002-0117>
 14. *Stengel A, Taché Y* (2010) Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. *Exp Biol Med* (Maywood) 235: 1168–1178.
<https://doi.org/10.1258/EBM.2010.009347>
 15. *Vasconcelos M, Stein DJ, Gallas-Lopes M, Landay L, R de Almeida RMM* (2020) Corticotropin-releasing factor receptor signaling and modulation: implications for stress response and resilience. *Trends Psychiatry Psychother* 42: 195–206.
<https://doi.org/10.1590/2237-6089-2018-0027>
 16. *Perrin MH, Vale WW* (1999) Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 885: 312–328.
<https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1999.TB08687.X>
 17. *Rivier JE, Kirby DA, Lahrachi SL, Corrigan A, Vale WW, Rivier CL* (1999) Constrained corticotropin releasing factor antagonists (astressin analogues) with long duration of action in the rat. *J Med Chem* 42: 3175–3182.
<https://doi.org/10.1021/JM9902133>
 18. *Rivier JE, Rivier CL* (2014) Corticotropin-releasing factor peptide antagonists: design, characterization and potential clinical relevance. *Front Neuroendocrinol* 35: 161–170.
<https://doi.org/10.1016/J.YFRNE.2013.10.006>
 19. *Liposits Z, Paull WK, Sédó G, Vigh S* (1985) Evidence for local corticotropin releasing factor (CRF)-immunoreactive neuronal circuits in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. An electron microscopic immunohistochemical analysis. *Histochemistry* 83: 5–16.
<https://doi.org/10.1007/BF00495294>
 20. *Sawchenko PE, Imaki T, Potter E, Kovács K, Imaki J, Vale W* (1993) The functional neuroanatomy of corticotropin-releasing factor. *Ciba Found Symp* 172: 5–21.
<https://doi.org/10.1002/9780470514368.CH2>
 21. *Kovács KJ* (2013) CRH: the link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *J Chem Neuroanat* 54: 25–33.
<https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2013.05.003>
 22. *Deussing JM, Chen A* (2018) The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. *Physiol Rev* 98: 2225–2286.
<https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00042.2017>
 23. *Jiang Z, Rajamanickam S, Justice NJ* (2019) CRF signaling between neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) coordinates stress responses. *Neurobiol Stress* 11: 100192.
<https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2019.100192>
 24. *Lichlyter DA, Krumm ZA, Golde TA, Doré S* (2022) Role of CRF and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in stroke: revisiting temporal considerations and targeting a new generation of

- therapeutics. FEBS J.
<https://doi.org/10.1111/FEBS.16380>
25. Tache Y, Larauche M, Yuan P-Q, Million M (2018) Brain and Gut CRF Signaling: Biological Actions and Role in the Gastrointestinal Tract. *Curr Mol Pharmacol* 11: (1): 51–71.
<https://doi.org/10.2174/1874467210666170224095741>
 26. Gunion MW, Kauffman GL, Tache Y (1990) Intrahypothalamic corticotropin-releasing factor elevates gastric bicarbonate and inhibits stress ulcers in rats. *Am J Physiol* 258 (Pt 1): G152–G157.
<https://doi.org/10.1152/AJPGI.1990.258.1.G152>
 27. Shibasaki T, Yamauchi N, Hotta M, Masuda A, Oono H, Wakabayashi I, Ling N, Demura H (1990) Brain corticotropin-releasing factor acts as inhibitor of stress-induced gastric erosion in rats. *Life Sci* 47: 925–932.
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(90\)90539-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(90)90539-4)
 28. Wang L, Cardin S, Martínez V, Taché Y (1996) Intracerebroventricular CRF inhibits cold restraint-induced c-fos expression in the dorsal motor nucleus of the vagus and gastric erosions in rats. *Brain Res* 736: 44–53.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00726-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00726-3)
 29. Robert A, Nezamis JE (1958) Ulcerogenic property of steroids. *Proc Soc Exp Biol Med* 99: 443–447.
<https://doi.org/10.3181/00379727-99-24378>
 30. Martínek J, Hlavova K, Zavada F, et al (2010) “A surviving myth”—corticosteroids are still considered ulcerogenic by a majority of physicians. *Scand J Gastroenterol* 45: 1156–1161.
<https://doi.org/10.3109/00365521.2010.497935>
 31. Филаретова ЛП (1990) Зависимость формирования стрессорных язв желудка от функции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы. *Физиол журн СССР им ИМ Сеченова* 76: 1594–600. [Filaretova LP (1990) The dependence of the formation of stress stomach ulcers on the function of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal cortical system. *Fiziol Zh SSSR im IM Sechenova* 76: 1594–1600. (In Russ)].
 32. Филаретова ЛП, Филаретов АА (1992) Влияние больших доз кортикостероидов на язвообразование в желудке: новая гипотеза. *Физиол журн СССР им ИМ Сеченова* 78(10): 77–83. [Filaretova LP, Filaretov AA (1992) The effect of large doses of corticosteroids on stomach ulcer formation: a new hypothesis. *Fiziol Zh SSSR im IM Sechenova* 78(10): 77–83. (In Russ)].
 33. Филаретова ЛП (1995) Стрессорные язвы желудка: защитная роль гормонов гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 81(3): 50–60. [Filaretova LP (1995) Gastric stress ulcers: the protective role of hormones of the hypothalamo-hypophyseal-adrenocortical system. *Russ J Physiol* 81(3): 50–60. (In Russ)].
 34. Filaretova LP, Filaretov AA, Makara GB (1998) Corticosterone increase inhibits stress-induced gastric erosions in rats. *Am J Physiol* 274: G1024–G1030.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.6.G1024>
 35. Filaretova L, Bagaeva T, Podvigina T, Makara G (2001) Various ulcerogenic stimuli are potentiated by glucocorticoid deficiency in rats. *J Physiol (Paris)* 95: 59–65.
[https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00069-9](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00069-9)
 36. Filaretova LP, Bagaeva TR, Amagase K, Takeuchi K (2008) Contribution of glucocorticoids to protective influence of preconditioning mild stress against stress-induced gastric erosions. *Ann N Y Acad Sci* 1148: 209–212.
<https://doi.org/10.1196/annals.1410.005>
 37. Filaretova L (2017) Gastroprotective Effect of Stress Preconditioning: Involvement of Glucocorticoids. *Curr Pharm Des* 23: 3923–3927.
<https://doi.org/10.2174/1381612823666170215145125>
 38. Filaretova L (2006) The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Hormonal brain-gut interaction and gastroprotection. *Auton Neurosci* 125: 86–93.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.01.005>
 39. Filaretova L, Podvigina T, Yarushkina N (2020) Physiological and Pharmacological Effects of Glucocorticoids on the Gastrointestinal Tract. *Curr Pharm Des* 26: 2962–2970.
<https://doi.org/10.2174/1381612826666200521142746>
 40. Filaretova L, Podvigina T, Bagaeva T, Bobryshev P, Takeuchi K (2007) Gastroprotective role of glucocorticoid hormones. *J Pharmacol Sci* 104: 195–201.
<https://doi.org/10.1254/jphs.cp0070034>
 41. Filaretova L, Podvigina T, Bagaeva T, Morozova O (2014) From Gastroprotective to Ulcerogenic Effects of Glucocorticoids: Role of Long-Term Glucocorticoid Action. *Curr Pharm Des* 20: 1045–1050.
<https://doi.org/10.2174/13816128113199990419>
 42. Филаретова ЛП, Багаева ТР, Морозова ОЮ (2012) Гастропротективное действие кортикотропин-релизинг фактора (КРФ): вовлечение глюкокортикоидов и рецепторов КРФ 2-го типа. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 98(12): 1555–1566. [Filaretova LP, Bagaeva TP,

- Morozova OIu* (2012) Gastroprotective action of corticotropin-releasing factor (CRF): involvement of glucocorticoids and CRF receptors type 2. *Russ J Physiol* 98(12): 1555–1566. (In Russ)].
43. *Filaretova L, Bagaeva T, Morozova O* (2012) Stress and the stomach: Corticotropin-releasing factor may protect the gastric mucosa in stress through involvement of glucocorticoids. *Cell Mol Neurobiol* 32: 829–836.
<https://doi.org/10.1007/s10571-012-9800-z>
 44. *Filaretova L, Bagaeva T* (2016) The Realization of the Brain–Gut Interactions with Corticotropin–Releasing Factor and Glucocorticoids. *Curr Neuropharmacol* 14(8): 876–881.
<https://doi.org/10.2174/1570159x14666160614094234>
 45. *Filaretova LP* (2018) The Contribution of corticotropin-releasing factor to gastroprotection. *Neurochem J* 12 (2): 127–129.
<https://doi.org/10.1134/S1819712418020046>
 46. *Filaretova LP, Morozova OY, Yarushkina NI* (2021) Peripheral corticotropin-releasing hormone may protect the gastric musosa against indometacin-induced injury through involvement of glucocorticoids. *J Physiol Pharmacol* 72: 1–10.
<https://doi.org/10.26402/JPP.2021.5.06>
 47. *Селье Г* (1960) Очерки об адаптационном синдроме. Москва. Медгиз. [Selye H (1960) The Story of the adaptation syndrome. Moscow. Medgiz. (In Russ)].
 48. *Szabo S* (1998) Hans Selye and the development of the stress concept. Special reference to gastroduodenal ulcerogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 851: 19–27.
<https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1998.TB08972.X>
 49. *Szabo S, Tache Y, Somogyi A* (2012) The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief “letter” to the editor# of nature. *Stress* 15: 472–478.
<https://doi.org/10.3109/10253890.2012.710919>
 50. *Filaretov AA* (1976) The afferent input and functional organization of the hypothalamus in reactions regulating pituitary-adreno-cortical activity. *Brain Res* 107: 39–54.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90094-9)
 51. *Filaretov AA, Vassilevskaya LV* (1978) Electrical activity of hypothalamus during activation of pituitary-adrenocortical system. *Brain Res* 156: 67–74.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90079-3)
 52. *Филаретова ЛП, Подвигина ТТ, Багаева ТР, Филаретов АА* (1995) Длительное угнетение функции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы у крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 81: 24–31. [*Filaretova LP, Podvigina TT, Bagaeva TR, Filaretov AA* (1995) The long-term depression of the function of the hypothalamo-hypophyseal-adrenocortical system in rats. *Russ J Physiol* 81: 24–31. (In Russ)].
 53. *Filaretov AA, Filaretova LP* (1985) Role of the paraventricular and ventromedial hypothalamic nuclear areas in the regulation of the pituitary-adrenocortical system. *Brain Res* 342: 135–140.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91361-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91361-7)
 54. *Филаретова ЛП* (1985) Роль паравентрикулярного и вентромедиального ядер гипоталамуса в активации гипофизарно-адренокортикальной системы. *Физиол журн СССР им ИМ Сеченова* 71: 1063–1066. [*Filaretova LP* (1985) Role of the paraventricular and ventromedial nuclei of the hypothalamus in activating the hypophyseal-adrenocortical system. *Fiziol Zh SSSR im IM Sechenova* 71: 1063–1066. (In Russ)].
 55. *Baertschi AJ, Bény JL, Gähwiler B* (1982) Hypothalamic paraventricular nucleus is a privileged site for brain-pituitary interaction in long-term tissue culture. *Nature* 295: 145–147.
<https://doi.org/10.1038/295145A0>
 56. *Ixart G, Alonso G, Szafarczyk A, Malaval F, Nouguiet-Soule J, Assenmacher J* (1982) Adrenocorticotrophic regulations after bilateral lesions of the paraventricular or supraoptic nuclei and in Brattleboro rats. *Neuroendocrinology* 35: 270–276.
<https://doi.org/10.1159/000123393>
 57. *Филаретов АА, Филаретова ЛП, Богданов АИ* (1985) Электрическая активность паравентрикулярного ядра гипоталамуса при возбуждении и торможении гипофизарно-адренокортикальной системы. *Докл Акад Наук СССР* 281: 230–232. [*Filaretov AA, Filaretova LP, Bogdanov AI* (1985) Electrical activity of the paraventricular hypothalamic nucleus during excitation and inhibition of the hypophyseal-adrenal cortex system. *Dokl Akad Nauk SSSR* 281: 230–232. (In Russ)].
 58. *Филаретов АА, Филаретова ЛП* (1984) Роль гипоталамуса в торможении гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы по механизму обратной связи. *Бюлл эксп биол мед* 97(5): 519–520. [*Filaretov AA, Filaretova LP* (1984) Role of the hypothalamus in inhibiting the hypophysis-adrenal cortex system through the feedback mechanism *Biull Eksp Biol Med* 97(5): 519–520. (In Russ)].
 59. *Филаретов АА, Балашов ЮГ, Ярушкина НИ, Подвигина ТТ* (1988) Роль гипофиза и гипоталамуса в регуляции обратной связи гипофизарно-адренокортикальной системы. *Физиол журн СССР им ИМ Сеченова* 74: 124–129. [*Filaretov AA, Balashov YuG, Yarushkina NI, Podvigina TT* (1988) Role of the hypophysis and hypothalamus in the control of feedback of the hypophyseal-adrenocortical system. *Fiziol Zh SSSR im IM Sechenova* 74: 124–129. (In Russ)].

60. *Filaretov AA, Balashov YG, Yarushkina NI, Podvigina TT* (1988) Corticosteroid Feedback: II. Role of Hypothalamus and Hypophysis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 91(2): 149–154. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1210737>
61. *Sawchenko PE* (1987) Adrenalectomy-induced enhancement of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons: anatomic, peptide, and steroid specificity. *J Neurosci* 7: 1093–1106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-04-01093.1987>
62. *Harbuz MS, Lightman SL* (1989) Glucocorticoid inhibition of stress-induced changes in hypothalamic corticotrophin-releasing factor messenger RNA and proenkephalin A messenger RNA. *Neuropeptides* 14: 17–20. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(89\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0143-4179(89)90029-2)
63. *Imaki T, Nahan JL, Rivier C, Sawchenko PE, Vale W* (1991) Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress. *J Neurosci* 11: 585–599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-03-00585.1991>
64. *Herman JP, Nawreen N, Smail MA, Cotella EM* (2020) Brain mechanisms of HPA axis regulation: neurocircuitry and feedback in context Richard Kvetnansky lecture. *Stress* 23: 617–632. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1859475>
65. *Kageyama K, Suda T* (2009) Regulatory mechanisms underlying corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamus. *Endocr J* 56: 335–344. <https://doi.org/10.1507/ENDOCRJ.K09E-075>
66. *Makino S, Hashimoto K, Gold PW* (2002) Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 147–158. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00791-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00791-8)
67. *Cole AB, Montgomery K, Bale TL, Thompson SM* (2022) What the hippocampus tells the HPA axis: Hippocampal output attenuates acute stress responses via disynaptic inhibition of CRF+PVN neurons. *Neurobiol Stress* 20: 100473. <https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2022.100473>
68. *Myers B, McKlveen JM, Herman JP* (2012) Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback. *Cell Mol Neurobiol* 32: 683–694. <https://doi.org/10.1007/S10571-012-9801-Y>
69. *Филаретова ЛП* (1983) Роль паравентрикулярного ядра гипоталамуса в торможении гипофизарно-адренкортикальной системы. *Докл Акад Наук СССР* 273(1): 248–250. [*Filaretova LP* (1983) Role of the paraventricular hypothalamic nuclei in the inhibition of the hypophyseal-adrenocortical system. *Dokl Akad Nauk SSSR* 273(1): 248–250. (In Russ)].
70. *Merchenthaler I, Hynes MA, Vigh S, Schally AV, Petrusz P* (1984) Corticotropin releasing factor (CRF): origin and course of afferent pathways to the median eminence (ME) of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 39: 296–306. <https://doi.org/10.1159/000123996>
71. *Herman JP, Cullinan WE, Ziegler DR, Tasker JG* (2002) Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *Eur J Neurosci* 16: 381–385. <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2002.02133.X>
72. *Филаретов АА* (1987) Принципы и механизмы регуляции гипофизарно-адренкортикальной системы. Л. Наука. [*Filaretov AA* (1987) Principles and mechanisms of regulation of the pituitary-adrenocortical system. L. Nauka. (In Russ)].
73. *Филаретов АА* (1996) Функциональное значение многозвенного строения гипоталамо-гипофизарной нейроэндокринной системы. *Усп физиол наук* 27: 3–11. [*Filaretov AA* (1996) The functional significance of the multiunit construction of the hypothalamo-hypophyseal neuroendocrine systems. *Usp Fiziol Nauk* 27: 3–11. (In Russ)].
74. *Bakke HK, Bogsnes A, Murison R* (1990) Studies on the interaction between ICV effects of CRF and CNS noradrenaline depletion. *Physiol Behav* 47: 1253–1260. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90379-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90379-1)
75. *Ray A, Henke PG, Gulati K, Sen P* (1993) The amygdaloid complex, corticotropin releasing factor and stress-induced gastric ulcerogenesis in rats. *Brain Res* 624: 286–290. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90089-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90089-6)
76. *Filaretova LP, Bagaeva TR, Morozova OY, Mayzina MA* (2012) Corticotropin-Releasing Factor May Protect the Gastric Mucosa in Stress through Involvement of Glucocorticoids. In: *Filaretova LP, Takeuchi K* (eds): *Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection in the Gastrointestinal Tract: Mechanisms, Prevention and Treatment*. Front Gastrointest Res. Basel. Karger. 124–133. <https://doi.org/10.1159/000338424>
77. *Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Schally AV, Petrusz P* (2003) Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24: 151–180. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2003.07.001>

78. *Watts AG, Sanchez-Watts G* (2002) Interactions between heterotypic stressors and corticosterone reveal integrative mechanisms for controlling corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat paraventricular nucleus. *J Neurosci* 22: 6282–6289. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-14-06282.2002>
79. *Филаретов АА, Подвигина ТТ, Филаретова ЛП* (1994) Адаптация как функция гипофизарно-адренокортикальной системы. СПб. Наука. [*Filaretov AA, Podvigina TT, Filaretova LP* (1994) Adaptation as a function of the pituitary-adrenocortical system. St. Petersburg. Nauka. (In Russ)].

From Hypothalamic Regulation of Pituitary-Adrenocortical Axis to Participation of Glucocorticoids in Gastroprotective Action of Corticotropin-Releasing Factor

L. P. Filaretova^{a, *} and O. Yu. Morozova^a

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

^{*}*e-mail: filaretovalp@infran.ru*

The hypothalamic paraventricular nucleus is recognized as the principal source of corticotropin-releasing factor (CRF) in hypophysial portal system. CRF plays a central role in stress response by stimulating the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, initiating a cascade of events that culminate in the release of glucocorticoids. Several mechanisms are involved in the control of HPA axis activation, including glucocorticoid feedback inhibition as a prominent mechanism in regulating of glucocorticoid release. Besides the development of adaptive physiological reactions to stress, pathological somatic and psychic responses can also be developed, among others: gastric mucosal damage, erosion and ulceration. Both the gastric mucosal ulcerogenic and protective mechanisms are activated in response to stress. This review aims to introduce how an endocrinological approach to gastroenterological field can advance our understanding of the HPA axis role in regulation of gastric mucosal integrity and uncover new findings. Our results on the role of the hypothalamic paraventricular nucleus in activation and glucocorticoid feedback inhibition of the HPA axis paved the way to experimental studies establishing that the activation of the HPA axis is gastroprotective component of stress response and stress-produced glucocorticoids act as gastroprotective hormones, and not as ulcerogenic agents as was generally accepted. These findings became the basis for the assumption that glucocorticoids may contribute to gastroprotective effect of CRF. The results obtained confirmed that exogenous CRF may protect the gastric mucosa against stress-induced as well as indomethacin-induced gastric injury through involvement of glucocorticoids. Together, the findings argue gastroprotective role of the HPA axis activation.

Keywords: paraventricular nucleus of hypothalamus, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, stress, corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, gastroprotection

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ЛАКТАТ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА РОЛЬ
ЭВОЛЮЦИОННО ДРЕВНЕГО МЕТАБОЛИТА

© 2022 г. О. П. Шатова^{1, 4} *, П. В. Шегай², А. А. Заболотнева¹,
А. В. Шестопапов^{1, 3}, А. Д. Каприн^{2, 4}

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

⁴Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

*E-mail: shatova.op@gmail.com

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 08.10.2022 г.

Принята к публикации 23.10.2022 г.

В статье представлен новый взгляд на роль лактата в организме человека. Показано, что лактат имеет как положительные, так и отрицательные эффекты, которые зависят от его концентрации. Установлено, что концентрация лактата до 15 мМ является оптимальной для реализации положительных эффектов данной молекулы. К положительным эффектам лактата можно отнести его участие в регенерации тканей, сохранении целостности нейронов при снижении уровня глюкозы, стимуляцию катаболизма аденозина и, как следствие, уменьшение опухолевой иммуносупрессии, обеспечение стволового фенотипа клеток. Отрицательные эффекты для лактата регистрируются при его концентрации выше 15 мМ. К отрицательным эффектам можно отнести активацию лактатом катаболизма гиалуроновой кислоты и ремоделирование внеклеточного матрикса, стимуляцию образования опухолевых экзосом, обеспечение пролиферации опухолевых клеток, а также подавление иммунного ответа. Именно лактат является предшественником для многих метаболитов цикла трикарбоновых кислот в опухоли, часть из которых является онкометаболитами. Возможно, что гиперпродукция лактата опухолью является не только проявлением агрессии, но и адаптивной реакцией со стороны клеток опухолевого микроокружения, которое таким образом регулирует работу генов-мишеней, вызывая целый каскад метаболических и физиологических событий.

Ключевые слова: лактат, молочная кислота, гликолиз, канцерогенез, злокачественные опухоли, эволюционная онкология

DOI: 10.31857/S0869813922120111

ВВЕДЕНИЕ

Задумываясь о роли лактата при опухолевом росте, непроизвольно приходит на ум следующая аллегория. Общепринято считать, что рак “пятится назад”. Также и опухолевые клетки подвергаются дедифференцировке или иначе репримитивизации, также “пятятся назад” на пути своей трансформации и включают более древ-

ние с точки зрения эволюции пути энергообеспечения. Однако это всего лишь заблуждение, что рак всегда перемещается назад, он это делает исключительно в случае избегания опасности, как и многие другие живые существа. Возможно, что и гиперпродукция лактата в организме онкобольного – это защитная реакция организма на повреждение и появление злокачественно трансформированных клеток.

Множество работ демонстрирует, что лактат выступает фактором агрессии опухолей [1–3]. Однако эволюционная стабильность и универсальность гиперпродукции лактата при различных физиологических и патологических состояниях заставляет нас по-другому взглянуть на значение этой ключевой и универсальной сигнальной молекулы. В настоящем обзоре мы постарались суммировать позитивные и негативные эффекты лактата, позволяющие оценить его вклад в злокачественную трансформацию клеток и противоопухолевую защиту, а также рассмотреть значение эффекта Варбурга с точки зрения эволюционной теории.

ГЛИКОЛИЗ – ЭВОЛЮЦИОННО ДРЕВНИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПУТЬ, КОТОРЫЙ ОБЕСПЕЧЕН РАБОТОЙ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Анаэробный способ получения энергии (гликолиз) возник еще до появления в процессе эволюции эукариот и представляет собой один из наиболее древних способов энергообеспечения клетки [4]. Кроме того, гликолиз был возможен и без участия гликолитических ферментов. Некоторые исследователи придерживаются мнения, что неферментативный гликолиз обеспечивался высоким содержанием железа и более кислой средой обитания древних форм жизни [4]. В свете “атавистической теории канцерогенеза” данные утверждения выглядят привлекательно, так как для опухолевых клеток характерно и состояние ацидоза [5], и сверхэкспрессия генов, которые кодируют трансферриновые рецепторы (TfR) [6]. Так, опухолевые клетки являются “ловушками” не только глюкозы [7], но и железа [8]. В многочисленных исследованиях было показано как увеличение экспрессии генов, кодирующих ферменты гликолиза, так и высокая активность данных ферментов в опухолях различной локализации [9–11]. Однако в работах независимых научных групп значительно меньше внимания уделено вопросу компартиментализации ферментов гликолиза и их некаталитической роли в канцерогенезе и опухолевой прогрессии [12–16]. Известно, что активация ферментов гликолиза происходит не только в самой опухоли: у онкологических пациентов наблюдается повышение активности гликолитических ферментов и в клетках крови [17], что можно рассматривать как системное изменение метаболизма глюкозы в организме онкобольных. Более того, повышение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) характерно не только для злокачественных новообразований, но и для доброкачественных опухолей [17]. Также следует добавить, что гены, кодирующие ферменты гликолиза, сверхэкспрессированы в опухолевых тканях, так как гликолитические ферменты относятся к так называемым “moonlight proteins” (дословно: “подрабатывающие белки”), обладающие полифункциональностью [18], что также может быть использовано как с целью опухолевой экспансии, так и с целью подавления опухолевого роста.

Опухолевые клетки эффективно используют процесс гликолиза для получения большого количества лактата – метаболита, который позволяет не только получать энергию, но и перепрограммировать клетки опухолевого микроокружения таким образом, чтобы создать наиболее благоприятные условия для роста и метастазирования опухолевых клеток [2]. Изучение роли лактата в злокачественной трансформации клеток становится еще более актуальным в свете “атавистической теории канцерогенеза”, предполагающей, что опухолевые клетки в ходе микроэволюции возвращаются к более примитивному наследственному фенотипу [19]. Поэтому

еще одним аргументом в пользу “атавистической теории канцерогенеза” может служить тот факт, что клетки опухолей в качестве основного метаболического пути утилизации глюкозы используют гликолиз, но не окислительное фосфорилирование: еще 100 лет назад в 1920-х годах Отто Варбург (Otto H. Warburg), исследуя срезы опухолевых тканей, обнаружил, что злокачественные клетки преимущественно превращают глюкозу в лактат даже в условиях адекватной клеточной оксигенации (т.е. в отсутствие гипоксии) [20]. О. Варбург связал такую метаболическую особенность опухолевых клеток, названную им “аэробный гликолиз”, с повреждением митохондрий и указал, что такое изменение метаболизма является ключевым признаком злокачественной трансформации клеток [21]. Однако в настоящее время эффект Варбурга связывают с метаболическим перепрограммированием, сопровождающим опухолевую трансформацию и необходимым для быстрого роста и пролиферации опухолевых клеток, поддержания их стволовых свойств, избегания ответа иммунной системы и выживания [1]. Благодаря многочисленным исследованиям последних лет стали известны сигнальные свойства лактата, которые в некоторой степени приоткрывают механизмы малигнизации клеток и позволяют взглянуть на их эволюционное значение [2]. Таким образом, взгляд на биологическую роль лактата претерпел значительные изменения в последние десятилетия: от ошибочного представления о лактате как о “тупике метаболизма” к пониманию важнейшей роли лактата в метаболизме и его регуляции [22].

Показано, что гиперпродукция лактата обеспечена не только самими опухолевыми клетками, но и клетками микроокружения, которые являются главными поставщиками лактата в опухоли. Также установлено, что в самой опухоли наблюдается “метаболический симбиоз” – клетки, которые находятся в гипоксических областях опухоли, продуцируют лактат, а клетки, которые находятся в нормоксических областях, поглощают данный лактат и утилизируют его как “удобоваримую” топливную молекулу [23]. Перемещаясь между клетками-продуцентами (драйверами) и клетками-потребителями (реципиентами), лактат выполняет как минимум три ключевые функции: 1) топливную – клетки-реципиенты гиперэкспрессируют монокарбоксилатный транспортер 1-го типа (MCT-1), благодаря которому осуществляют импорт лактата [23]; 2) сигнальную – участвующую в том числе в метаболическом перепрограммировании клеток [24] и 3) анаболическую – является предшественником в образовании метаболитов цикла трикарбоновых кислот и глюкозо-6-фосфата [23]. При этом сигнальная функция лактата представляет наибольший интерес в плане исследования механизмов злокачественной трансформации клеток: с одной стороны лактат – метаболит гликолиза, является одной из наиболее древних сигнальных молекул, выполняющей регуляторные функции как у эу-, так и прокариот [25]; с другой стороны – действие лактата поразительно многостороннее. Как описано ниже, лактат – ключевой онкометаболит, обеспечивающий энергетическое снабжение опухолевых клеток, трансформацию опухолевого микроокружения и, таким образом, рост, инвазию и метастазирование трансформированных клеток.

НЕКОТОРЫЕ НЕГАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ, КОТОРЫЕ ОБУСЛОВЛЕННЫ ГИПЕРПРОДУКЦИЕЙ ЛАКТАТА

Наблюдаемый в опухолях эффект Варбурга можно рассматривать как возвращение к древним гипоксическим корням ранней многоклеточной жизни [26], а может и к метаболическому профилю FUCA (The First Universal Common Ancestor). Можно сказать, что злокачественно трансформированные клетки формируют свое микроокружение таким образом, что позволяет им создать благоприятные “атавистические” ниши для роста опухоли, в которых они смогут выиграть конкуренцию

со здоровыми клетками. Очень важным компонентом метаболического окружения опухолевых клеток является повышенное содержание молочной кислоты и соответственно ее аниона — лактата. Так, концентрация молочной кислоты в сыворотке человека в состоянии покоя составляет 1–3 мМ, но может временно повышаться до 15 мМ во время интенсивных физических нагрузок [27]. Содержание молочной кислоты в опухолевом микроокружении может достигать 10–30 мМ [28, 29].

При изучении участия лактата в синтезе интермедиатов цикла трикарбоновых кислот в двух моделях рака легкого на мышах было показано, что этот вклад был выше, чем вклад глюкозы. Используя внутривенные инфузии ^{13}C -меченных питательных веществ, исследователи показали, что концентрация циркулирующего лактата является самой высокой из всех метаболитов и превышает концентрацию глюкозы в опухолях легких человека [30, 31]. Также недавно было продемонстрировано, что ^{13}C -пируват в основном превращается в лактат, что почти всегда взаимосвязано с прогрессированием опухоли и ее метастазированием [32]. Помимо глюкозы и пирувата предшественником лактата может быть глутамин [33]. При этом объем потребления и метаболизма глутамина связан со стабилизацией HIF1- α (Hypoxia-Inducible Factor 1- α) самим лактатом. Известно, что c-MYC активирует экспрессию генов, которые кодируют транспортер глутамина (SCL1A5) и глутаминазу 1 (GLS1), что приводит к увеличению захвата и обмена глутамина в опухолевых клетках [23, 34].

Известно, что одним из способов, с помощью которого опухолевые клетки выживают в условиях нехватки питательных веществ, является перекрестный контакт между клетками стромы из микроокружения опухоли и опухолевыми клетками. В этом процессе, известном как “обратный эффект Варбурга”, аэробный гликолиз интенсифицирован в снабжающих опухолевые клетки лактатом опухоль-ассоциированных фибробластах (ОАФ), а не в самих опухолевых клетках [35]. ОАФ составляют более многочисленную клеточную популяцию в опухолях и непосредственно обеспечивают ее прогрессирование, инвазию и метастазирование через паракринные сигнальные механизмы [36]. Важно отметить, что опухолевые клетки за счет повышенной продукции активных форм кислорода рекрутируют ОАФ и за счет окислительных реакций модифицируют их, что инициирует катаболические пути, такие как аутофагия и митофагия [37]. Содержимое аутофагосом в результате лизосомального слияния деградирует и поступает в цитозоль ОАФ [37], тогда как в результате митофагии происходит разрушение митохондрий и соответственно безвозвратный переход ОАФ на гликолитический метаболизм. Таким образом, именно ОАФ становятся теми клетками, которые гиперпродуцируют лактат и стимулируют пролиферацию опухолевых клеток. В свою очередь усиление гликолиза способствует эпителиально-мезенхимальной трансформации, миграции и инвазии опухолевых клеток [37, 38].

Хорошо известной отличительной особенностью опухолевых клеток является их способность уклоняться от иммунного надзора. Учитывая относительно молодой эволюционный возраст адаптивного иммунитета (менее 500 миллионов лет), теория “канцерогенеза как процесса возврата к предковым формам” предсказывает, что адаптивный иммунный ответ не может быть полноценным в случае выраженной дедифференцировки клеток [26]. Одним из механизмов ускользания опухолевых клеток от иммунного надзора является создание кислой среды в опухолевом микроокружении, что способствует подавлению воспалительной реакции и активации иммунных клеток [39, 40]. Снижение pH в опухолевой нише приводит к ограничению образования интерферона гамма (IFN- γ) Т-клетками, инфильтрирующими опухоль, и предотвращает активацию натуральных киллеров, что в итоге способствует ускользанию опухоли от иммунного ответа и ее прогрессивному ро-

сту [41]. Кроме того, было показано, что молочная кислота может усиливать передачу сигналов, опосредованную толл-подобным рецептором 4 (TLR 4), генную регуляцию, зависящую от ядерного фактора NF-κB и провоспалительную функцию макрофагов [42]. Было продемонстрировано, что высокие концентрации лактата могут стимулировать поляризацию противовоспалительных макрофагов M2 посредством стабилизации HIF-1α или за счет эпигенетической регуляции – путем лактирования гистонов [43–45].

Молочная кислота также может играть решающую роль в функционировании дендритных клеток (DC) за счет: (1) снижения базальной экспрессии CD1 (молекула главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC I), запускающая иммунный ответ), (2) поддержания толерогенного фенотипа, характеризующегося сниженной секрецией интерлейкина-12 (IL-12) и повышенной секрецией IL-10 в ответ на стимуляцию TLR, и (3) нарушения миграционного ответа на хемокины [46]. Помимо этого, кислая среда опухолевого микроокружения приводит к снижению продукции цитокинов и к потере цитотоксических эффекторных функций Т-клеток, не влияя на их жизнеспособность [47]. Высокая концентрация молочной кислоты в микроокружении опухоли нарушает градиент $[H^+]$ между Т-клетками и их окружением, снижая опосредованный монокарбоксилатным транспортером (MCT1) экспорт молочной кислоты из Т-клеток. Это ингибирует пролиферацию эффекторных Т-клеток [45, 48].

Лактат, продуцируемый опухолевыми клетками, способствует активации эндотелиальных клеток и ангиогенезу с помощью зависимого и независимого от HIF-1α механизмов. При этом оба механизма задействуют импорт лактата клетками опухолевого микроокружения через транспортер MCT1 и последующее ингибирование работы пролилгидроксилаз, что защищает HIF-1α от протеасомной деградации и способствует активации проангиогенного IL-8 или индуцирует экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) для промоции сосудистого роста. Таким образом, HIF-1α может быть стабилизирован не только в условиях гипоксии, но также и нормоксии с помощью лактата. Накопление лактата позволяет опухолевым клеткам активировать экспрессию проканцерогенных генов за счет транскрипционной активности HIF-1α независимо от поступления кислорода [49].

Лактат является одним из факторов, необходимых для миграции клеток глиомы за счет индукции транскрипции трансформирующего фактора роста бета-2 (TGF-β2) [50]. В свою очередь TGF-β2 усиливает экспрессию, секрецию, и активацию матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2) и индуцирует экспрессию рецепторов интегрин на клеточной поверхности [50].

Помимо этого, выход молочной кислоты из опухолевых клеток во внеклеточную среду (микроокружение) и, как следствие, ацидификация способствуют секреции экзосом опухолевыми клетками. Экзосомы представляют собой микровезикулы, содержащие микроРНК, ферменты, структурные белки и другие молекулы, необходимые для метаболического перепрограммирования опухолевого микроокружения. В клетках микроокружения захватываемые экзосомы могут индуцировать эпигенетические изменения или переносить онкогены и онко-микроРНК, способствующие перестройке метаболизма окружающих опухоль клеток и дальнейшему росту опухоли [51].

Механизмы влияния лактата на индукцию канцерогенеза и его прогрессию предполагают активирование катаболизма гиалуроновой кислоты в связанных с опухолью фибробластах, стимуляцию VEGF и HIF-1α [52]. Показано, что не только HIF-1α индуцирует экспрессию гликолитических ферментов и таким образом регулирует гликолиз, но и метаболиты гликолиза (к примеру, пируват) и цикла трикарбоновых кислот (оксалоацетат, сукцинат и фумарат), при их накоплении в клетке (из-за нарушения соотношений между гликолизом и окислительным фос-

форилированием), активируют HIF-1 α [53]. Кроме того, пируват предотвращает аэробную деградацию HIF-1 α и усиливает экспрессию активируемых HIF-1 α генов, включая эритропоэтин, VEGF, глюкозный транспортер-3 (GLUT-3) и альдолазу А [54]. В свою очередь повышение экспрессии VEGF является одним из ключевых событий в ангиогенезе и последующей гематогенной диссеминации злокачественно трансформированных клеток.

Способность лактата выступать в качестве сигнальной молекулы стала известна с момента открытия рецептора для лактата GPR81, экспрессирующегося в адипоцитах, мышечных, иммунных, нервных и опухолевых клетках [55]. Рецептор GPR81 относится к типу ассоциированных с G-белками рецепторов, подсемейству гидроксикарбоновых рецепторов (HCARs), при этом подтип HCAR1, к которому относится GPR81, считается наиболее эволюционно консервативным среди всех других подтипов рецепторов HCARs. Впервые экспрессия GPR81 в злокачественных опухолях была продемонстрирована в 2014 г. [56]. Было показано, что рецептор активируется при многих видах новообразований, несмотря на незначительную экспрессию в доброкачественных клетках тех же тканей. В этой работе исследователи обнаружили, что подавление GPR81 в клеточных линиях рака поджелудочной железы значительно снижает экспрессию переносчиков лактата MCT1 и MCT4 и их белка-шаперона CD147 [56]. Нокдаун GPR81 снижал пролиферацию клеток рака молочной железы и рост опухоли [57]. Среди всех видов опухолей GPR81 в наибольшей степени экспрессируется при раке молочной железы, в особенности положительному по рецептору эстрогена (ER) [56, 58]. В исследовании было показано, что экспрессия GPR81 в клетках MCF-7 увеличивает продукцию проангиогенного амфирегулина через PI3K/Akt/cAMP-зависимый путь [58]. Помимо рака молочной и поджелудочной желез, проонкогенная функция GPR81 также связана с развитием гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы шейки матки и рака легкого [59]. Так, активация GPR81 связана с усиленной репарацией ДНК (за счет повышенной экспрессии генов, кодирующих ферменты репарации ДНК) и устойчивостью к химиотерапии [60]. Кроме того, GPR81 усиливает химиорезистентность к доксорубину в клетках HeLa за счет увеличения экспрессии и активности лекарственного переносчика ABCB1 [60]. При этом увеличение репарации ДНК и лекарственной устойчивости связано с активацией сигнальных путей PKC–ERK, подчиняющихся GPR81. Помимо регуляции ангиогенеза, репарации ДНК и химиорезистентности, активация GPR81 необходима и для избегания опухолевыми клетками иммунного ответа, поскольку активация рецептора повышает экспрессию связанного с мембраной PD-L1 на поверхности клеток рака легкого [59]. В частности, нижестоящая передача сигналов через Gi/o-белок приводит к транслокации TAZ/TEAD на промотор PD-L1 и последующей индукции экспрессии PD-L1 *in vitro*. Таким образом, лактат, генерируемый опухолевыми клетками и клетками их окружения, становится универсальным промотором опухолевого роста благодаря его способности вызывать аутокринные эффекты, включающие активацию GPR81, экспрессируемого на самих опухолевых клетках. Интересно, что лактат сам по себе индуцирует экспрессию GPR81 в опухолевых клетках посредством активации транскрипции с участием транскрипционного комплекса Snail/EZH2/STAT3 [61]. С другой стороны, лактат является паракринным регулятором, связываясь с рецепторами на клетках опухолевого микроокружения. Так, было обнаружено что GPR81 экспрессируется в иммунных клетках, инфильтрирующих опухоль, или в жировых клетках, составляющих значительную массу молочной железы, и вовлеченных таким образом в создание опухолевого микроокружения при раке молочной железы. Поскольку жировая ткань выполняет важную эндокринную функцию, активация GPR81, в том числе за счет лактата опухолевого

происхождения, может приводить к высвобождению большого числа цитокинов и других регуляторных факторов, влияющих на ангиогенез, васкуляризацию и опухолевый рост [62]. Однако точные механизмы и эффекты связывания лактата со своими рецепторами еще предстоит выяснить.

НЕКОТОРЫЕ ПОЗИТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ, КОТОРЫЕ ОБЕСПЕЧЕНЫ ГИПЕРПРОДУКЦИЕЙ ЛАКТАТА

В настоящее время вполне очевидно, что лактат имеет как негативные, так и позитивные эффекты в организме. Так, следствиями накопления лактата являются: (1) стабилизация HIF-1 α , (2) индукция экспрессии генов, кодирующих VEGF и TGF- β , (3) индукция экспрессии генов, кодирующих MMP, (4) усиление подвижности эндотелиоцитов, (5) улучшение васкуляризации тканей, (6) усиление синтеза и посттрансляционной модификации коллагена, а также его накопление, (7) повышение клеточной пролиферации, (8) индукция транскрипции генов протеогликанов, CD44, кавеолина-1 и (9) повышение продукции супероксид анион-радикала [63]. Все установленные эффекты, которые оказывает лактат, имеют как позитивное, так и негативное влияние на организм. Например, известна негативная роль лактата в неоангиогенезе и метастазировании различных опухолей [64], тогда как в норме лактат также обеспечивает ангиогенез и нормальный церебральный кровоток [65]. При этом установлено, что лактат выполняет нейропротекторную функцию и препятствует развитию нейродегенеративных заболеваний [65]. Так, установлено, что в клетках церебральных сосудов (периваскулярные пияльные и перицитоподобные клетки) сверхэкспрессированы рецепторы лактата GPR81. Активация GPR81 усиливает экспрессию VEGF-A в клетках головного мозга и, как следствие, церебральный ангиогенез [65]. GPR81 имеют идеальную локализацию в клетках, формирующих гематоэнцефалический барьер, что позволяет обнаруживать колебания лактата в интерстициальной жидкости мозга при изменении его метаболического состояния, а также детектировать увеличение концентрации циркулирующего лактата во время физических упражнений. При этом GPR81 может реагировать на лактат в пределах полного диапазона концентраций, зарегистрированных *in vivo* (0.5–30 мМ в крови и внеклеточной жидкости головного мозга) [65].

Процессы окисления лактата, вместе с гликолизом, обеспечивают поддержание окислительно-восстановительного потенциала в цитозоле и митохондриях, а это является очень важной гомеостатической константой [66]. Наряду с глицерол-3-фосфатным и малат-аспартатным челноками, лактатный челнок является внутриклеточной челночной системой, которая необходима для транспорта водорода от цитоплазматического НАДН·Н⁺ в митохондрии [66]. Благодаря “межклеточным лактатным челнокам” осуществляется кооперация клеток. “Межклеточные лактатные челноки” используют клетки с высокими энергетическими запросами (пролиферирующие, опухолевые, нейроны, сперматозоиды, особая субпопуляция кардиомиоцитов), дабы не “отвлекаться” на энергетически низкоэффективное окисление глюкозы до пирувата. За счет использования в качестве энергетического “сырья” лактата, который им любезно предоставляется окружающими стромальными или другими менее энергопотребляющими клетками, создается энергетическая кооперация между соседствующими клетками [66].

Ряд исследований посвящен изучению роли лактата в развитии воспаления. Показано, что экспрессия GPR81 в адипоцитах и эндотелиальных клетках снижается в условиях воспаления. При этом экспрессия GPR81 в иммунных клетках связана с защитой от воспаления и подавлением реакций врожденного иммунитета [67, 68]. Интересно, что активация GPR81 в миометрии во время беременности снижает его

воспаление, индуцированное липополисахаридом, а значит и риск преждевременных родов, и детскую смертность [69].

Лактат регулирует экспрессию генов, ответственных за процессы заживления ран [70]. Показано, что заживающая рана содержит высокие уровни лактата (10–15 мМ), что способствует усиленной продукции VEGF в эндотелиальных клетках и клеточной миграции [70].

Экзогенный лактат снижает пул окисленного НАД⁺ – субстрата для синтеза полиАДФ-рибозы. Так, в исследовании [71] иммунофлуоресцентным методом было определено образование полиАДФ-рибозы в изолированных фибробластах кожи новорожденных после инкубации с 15 мМ L-лактата (для сравнения использовали D-лактат). Показано, что экзогенный L-лактат значительно уменьшал содержание полиАДФ-рибозы в фибробластах, при этом значительно снижал соотношение НАД⁺/НАДН·Н⁺. Такого эффекта не было ни при использовании 100 мМ 3-аминобензамида – ингибитора поли(АДФ-рибозо)-полимеразы-1 (ПАРП-1), ни у D-лактата [71]. АДФ-рибоза является ингибитором пролилгидроксилазы коллагена; НАД⁺ является источником (субстратом) для АДФ-рибозы и соответственно подавляет синтез и созревание коллагена [63].

Установлено, что лейкоциты, имеющие мало митохондрий, в период своей активности (при раневом процессе) обеспечивают себя энергией преимущественно за счет гликолиза, производя при этом большое количество лактата вне зависимости от обеспеченности кислородом [63]. Более того, высокие концентрации лактата повышают иммунный противоопухолевый надзор. Так, лактат активирует ключевой фермент катаболизма аденозина – аденозиндезаминазу, и таким образом препятствует аденозинергической иммуносупрессии в опухолевом микроокружении, которая обеспечена высокой концентрацией аденозина [72]. Максимальное стимулирующее влияние лактата натрия на аденозиндезаминазу было установлено для концентрации лактата 15 мМ [73]. При опухолевом росте наблюдается аденозинергическая иммуносупрессия или “парадокс Хелстрема”. Показано, что гипоксия приводит к стабилизации HIF-1 α , а данный фактор, в свою очередь, модулирует синтез ферментов метаболизма аденозина: увеличивает экспрессию 5-нуклеотидазы и подавляет образование аденозинкиназы. Таким образом, HIF-1 α регулирует концентрацию внутриклеточного и соответственно внеклеточного аденозина [74]. При опухолевом росте высокие концентрации внеклеточного аденозина приводят к нарушению функциональной активности лимфоцитов. Известно, что и опухолевые, и T-регуляторные клетки продуцируют аденозин во внеклеточную среду, где последний связывается с A2A-рецепторами противоопухолевых клеток (T-киллеров), что приводит к увеличению в них цАМФ и снижению синтеза и секреции INF- γ [75]. Данные метаболические изменения приводят к нарушению иммунного ответа и опухолевой прогрессии. Особенности метаболизма опухолевых клеток (чрезмерная экспрессия ферментов гликолиза, мембранных переносчиков глюкозы, активация путей синтеза лактата из глутамина и аланина), а также недостаточная микроциркуляция приводят к накоплению в опухолевой ткани лактата в высоких концентрациях [72].

Повышенный уровень лактата обеспечивает энергетическую защиту мозга при гипоксии. Так, показано, что при гипергликемии существенно повышается гликолиз [76]. Авторы заключают, что рост уровня внутриклеточного лактата обладает нейротропными свойствами [77]. Кроме того, установлено, что астроциты гиперпродуцируют лактат как топливо для нейронов и при снижении уровня глюкозы нейроны используют лактат как топливную молекулу, не допуская нарушения синаптической передачи [78].

Все описанные обвинения молочной кислоте в развитии мышечной усталости основываются на наличии корреляционной связи между внутримышечной концентрацией этих ионов и снижением силы сокращений у лягушки, грызунов и человека. Кроме того, моделирование ацидоза приводит к симулированию мышечной усталости. Однако есть работы, показывающие защитные эффекты лактата и лактат-ацидоза на подавленную натрием сократительную способность изолированных мышц [79]. Прием лактата натрия внутрь способствует удлинению времени наступления утомления у спортсменов-спринтеров. На изолированных мышцах показано, что лактат-ацидоз имеет лишь слабый повреждающий эффект или, напротив, может улучшать производительность мышц при высокоинтенсивных нагрузках. Высказана гипотеза, что выраженный ацидоз у человека может снижать мышечную производительность путем подавления влияний со стороны центральной нервной системы [80].

Считалось, что при напряженной физической активности в мышцах (1) накапливается молочная кислота (приводит к снижению pH) и (2) калий выходит из миоцитов. Оба этих явления приводят к развитию мышечной усталости. На изолированной мышце крысы показано, что наличие в среде 11 мМ K^+ на 75% снижает силу сокращения, а добавки в инкубат 20 мМ молочной кислоты почти полностью восстанавливают сократительную способность. Восстановление сократимости сочеталось с восстановлением мышечной возбудимости, но не изменяло мембранный потенциал или обмен (транспорт) кальция. Авторы заключают, что ацидоз не только не приводит к усталости, но и наоборот, может способствовать восстановлению мышечной сократимости [81]. Результаты о защитном действии лактата на мышечную сократимость подтвердили и другие исследователи [81]. В экспериментах на изолированных покоящихся кардиомиоцитах крысы было обнаружено, что увеличение концентрации внеклеточного K^+ с 4 до 10 мМ подавляет силу сокращения на 20–25%. Добавление в инкубационную среду молочной кислоты (20 мМ) или лактата натрия (20 мМ) или же смеси кислоты (8 мМ) и ее натриевой соли (12 мМ) на 80% восстанавливало силу сокращения предварительно депрессированных солями калия (10 мМ) кардиомиоцитов. В этой работе также было доказано, что добавки лактата натрия усиливают вход катионов калия внутрь кардиомиоцитов. В отличие от описанных выше эффектов [81] авторы этого исследования не наблюдали подобного эффекта при соответствующем подкислении среды растворами соляной кислоты, то есть восстановление мышечной сократимости выглядит специфическим именно для ионов лактата. Примечательным и ожидающим особого объяснения является другое отличие результатов данной работы от [81] – не обнаружено указанных протективных эффектов молочной кислоты и ее солей на миоциты при условии их электростимуляции. Особенно выраженные защитные эффекты на возбудимость и сократимость изолированных мышц, предварительно депрессированных избытком внеклеточного K^+ , отмечаются при сочетанном добавлении в инкубационную среду и молочной кислоты (20 мМ) и адреналина (10 мМ) [82].

В одном из недавних обзоров авторы изложили позитивные эффекты применения лактата в коррекции некоторых патологических состояний [77]. Было показано, что лактат натрия можно безопасно вводить людям с индуцированной инсулином гипогликемией, черепно-мозговой травмой, болезнью Альцгеймера или сердечной недостаточностью [77]. Нами также было показано, что применение инфузий лактата натрия у пациентов с неспецифическим язвенным колитом и раком кишечника значительно улучшает течение этих заболеваний, что также коррелирует с увеличением содержания АТФ в эритроцитах данных больных [83]. Очевидно, что эк-

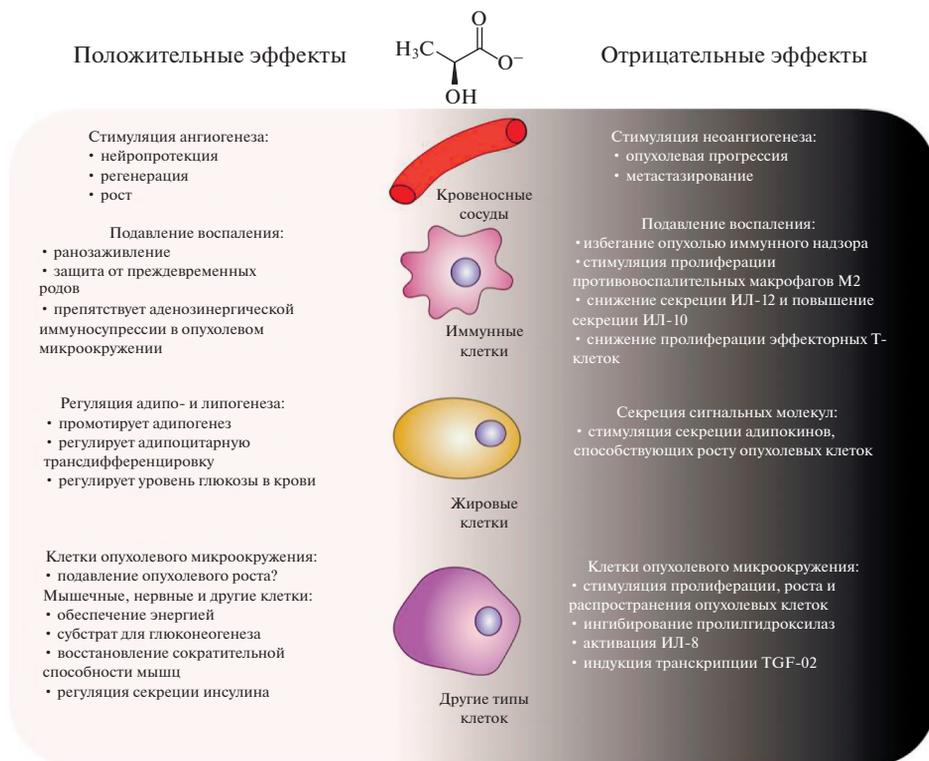


Рис. 1. На светлом фоне представлены некоторые положительные эффекты лактата: стимуляция ангиогенеза, подавление воспаления, регуляция адипо- и липогенеза; на темном фоне – некоторые отрицательные эффекты: стимуляция неоангиогенеза и метастазирование, подавление иммунного надзора и стимуляция секреции сигнальных молекул.

зогенный лактат стимулирует гликолиз в эритроцитах и, как следствие, уменьшает их дисфункцию, способствуя снижению гипоксических эффектов [83].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Очевидно, что опухолевые клетки “пятясь назад” защищают себя, в том числе путем репрограммирования метаболизма и увеличения продукции лактата. С другой стороны, возможно, что клетки микроокружения опухоли изменяют свой метаболизм в сторону интенсификации гликолиза и при определенных концентрациях лактата (до 15 мМ) активируют иммунный надзор и уничтожают опухолевые клетки за счет повышения катаболизма аденозина. Кроме того, известная системная интенсификация гликолиза (в клетках крови) может быть не только проявлением влияния опухоли на организм, но и первичным звеном состояния гиперметаболизма, которое определяет формирование соответствующих проканцерогенных ниш. Как в опухолевой, так и в нормальных тканях существует не только “прямой эффект Варбурга”, но также имеется и “обратный эффект Варбурга”. Данные эффекты являются проявлением “метаболической кооперации” клеток-продуцентов и клеток-реципиентов лактата. Например, такие клеточные кооперации образуют нейроны и астроциты или белые и красные мышечные волокна. Лактат является топливной молекулой, при этом необходимо отметить, что GLUT экспрессированы во

всех клетках, тогда как МСТ, которые позволяют получить лактат от клеток-доноров или системный лактат, имеются не у всех клеток, а лишь у лактатных клеток-реципиентов. Таким образом, лактат участвует в метаболических кооперациях клеток с разной скоростью метаболизма и содержанием гликогена, что очень важно при депривации глюкозы. Лактат принимает участие как в снижении иммунного надзора, так и в стимуляции противоопухолевого иммунитета. Видимо, действие лактата очень зависит от его концентрации, что подтверждают и наши исследования, показывающие дозозависимость влияния лактата на активность аденозиндезаминазы и миграционную активность лейкоцитов [72]. Также установлено, что лактат принимает участие в ангиогенезе и в неоангиогенезе. Позитивным эффектом при этом является предотвращение нейродегенерации и повреждения клеток нервной ткани, а негативным — это позволяет опухолевым клеткам десиминировать и метастазировать (рис. 1).

Конечно, еще предстоит ответить на многие и многие вопросы о роли лактата в организме. Однако базовая молекула эволюции многих организмов не может быть лишь зеркалом или драйвером исключительно канцерогенеза [52].

Существует множество вопросов о роли лактата и значения гликолиза, ответы на которые еще предстоит дать исследователям. Некоторые из них следующие:

1. Может ли в злокачественно трансформированных клетках осуществляться неферментативный гликолиз?

2. Если клетки микроокружения гиперпродуцируют лактат и H^+ для опухоли, это означает, что ниша создает комфортные условия для опухолевого роста или наоборот? Возможно, что организм, продуцируя лактат, адаптивно подавляет опухолевый рост?

3. Лактат участвует в метаболическом сопряжении для спасения клеток гипоксической зоны опухоли, при этом включаются те же механизмы, что и при имплантации, регенерации, воспалении, травме и гипо- или гипергликемии?

4. Лактат образуется не только из пирувата — продукта гликолитического окисления глюкозы. Еще предстоит изучить, какое количество аминокислот (глутамин, аланина и др.) и глицерола превращаются в пируват, а затем в лактат в опухолевых клетках и клетках их “комфортного” микроокружения.

5. Гиперактивация (а возможно и гиперэкспрессия) гликолитических ферментов происходит системно во всем организме, в том числе в клетках крови. В связи с чем сывороточный лактат, уровень которого резко повышается при опухолевом росте имеет различное происхождение. Зачем же всем клеткам включать гликолитический “переключатель”? Системная гиперпродукция лактата настраивает работу иммунокомпетентных клеток или наоборот?

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа профинансирована за счет госбюджета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

О.П.Ш. — написание разделов статьи; П.В.Ш. — идея статьи и написание разделов статьи; А.А.З. — написание разделов статьи и подготовка рисунка; А.В.Ш. — научное консультирование и коррекция текста; А.Д.К. — идея статьи, научное консультирование и финальная правка статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brooks GA* (2020) Lactate as a fulcrum of metabolism. *Redox Biol* 35: 101454. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101454>
2. *Rawat D, Chhonker SK, Naik RA, Mehrotra A, Trigun SK, Koiri RK* (2019) Lactate as a signaling molecule: Journey from dead end product of glycolysis to tumor survival. *Front Biosci –Landmark* 24: 366–381. <https://doi.org/10.2741/4723>
3. *Lewis BC, Prescott JE, Campbell SE, Shim H, Orlowski RZ, Dang CV* (2000) Tumor induction by the c-Myc target genes *rc1* and lactate dehydrogenase A. *Cancer Res* 60: (21): 6178–6183.
4. *Ralser M* (2018) An appeal to magic? The discovery of a non-enzymatic metabolism and its role in the origins of life. *Biochem J* 475(16): 2577–2592. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160866>
5. *Alfarouk KO, Muddathir AK, Shayoub MEA* (2011) Tumor acidity as evolutionary spite. *Cancers (Basel)* 3(1): 408–414.
6. *Hollander N, Urszula Zakrzewska M, Hyun Kang T, Daniels-Wells TR, Penichet ML, Sum Leoh L, Sdn Bhd R, Jaya S, Candalaria P* (2021) Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents. *Front Immunol* 12: 607692. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607692>
7. *Carvalho S, Gueiral N, Nogueira E, Henrique R, Oliveira L, Tuchin V* (2017) Glucose diffusion in colorectal mucosa—a comparative study between normal and cancer tissues. *J Biomed Opt* 22(9): 91506. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.9.091506>
8. *Yaman M, Kaya G, Simsek M* (2007) Comparison of trace element concentrations in cancerous and noncancerous human endometrial and ovary tissues. *Int J Gynecol Cancer* 17(1): 220–228. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00742.x>
9. *Dimri M, Varacallo M* (2022) Biochemistry, Aerobic Glycolysis. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publ.
10. *Wu Z, Wu J, Zhao Q, Fu S, Jin J* (2020) Emerging roles of aerobic glycolysis in breast cancer. *Clin Transl Oncol* 22(5): 631–646. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02187-8>
11. *Nowak N, Kulma A, Gutowicz J* (2018) Up-regulation of key glycolysis proteins in cancer development. *Open Life Sci* 13: 569–581. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0068>
12. *Majewski N, Nogueira V, Bhaskar P, Coy PE, Skeen JE, Gottlob K, Chandel NS, Thompson CB, Robey RB, Hay N* (2004) Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol Cell* 16(5): 819–830. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.014>
13. *Cieśla M, Mierzejewska J, Adamczyk M, Farrants AKÖ, Boguta M* (2014) Fructose bisphosphate aldolase is involved in the control of RNA polymerase III-directed transcription. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1843(6): 1103–1110. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.007>
14. *Li M, Zhang CS, Zong Y, Feng JW, Ma T, Hu M, Lin Z, Li X, Xie C, Wu Y, Jiang D, Li Y, Zhang C, Tian X, Wang W, Yang Y, Chen J, Cui J, Wu YQ, Chen X, Liu QF, Wu J, Lin SY, Ye Z, Liu Y, Piao HL, Yu L, Zhou Z, Xie XS, Hardie DG, Lin SC* (2019) Transient Receptor Potential V Channels Are Essential for Glucose Sensing by Aldolase and AMPK. *Cell Metab* 30(3): 508–524. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.018>
15. *Caspi M, Perry G, Skalka N, Meisel S, Firsow A, Amit M, Rosin-Arbesfeld R* (2014) Aldolase positively regulates of the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cancer* 13:164. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-164>
16. *Luisi PL* (2012) An open question on the origin of life: the first forms of metabolism. *Chem Biodivers* 9(11): 2635–2647. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200281>
17. *Shatova OP, Borzenko BG, Zinkovich II, Sedakov IE* (2009) Lactate dehydrogenase, adenosine deaminase and thymidine phosphorylase activity of blood and tissues in breast cancer. *Ukrain biokhim zhurn* 81(4): 88–93.
18. *Huberts DHEW, van der Klei IJ* (2010) Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1803(4): 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.022>
19. *Shegay PV, Zabolotneva AA, Shatova OP, Shestopalov AV, Kaprin AD* (2022) Evolutionary View on Lactate-Dependent Mechanisms of Maintaining Cancer Cell Stemness and Reprimitivization. *Cancers (Basel)* 14: 4552. <https://doi.org/10.3390/cancers14194552>

20. *Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A* (2019) The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int J Radiat Biol* 95(7): 912–919. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589653>
21. *Warburg O* (1956) Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science* (1979) 123(3191): 309–414. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
22. *Porporato PE, Pouyssegur J, Rumjanek FD, Baltazar F, Afonso J, Costa M, Granja S* (2020) Lactate Beyond a Waste Metabolite: Metabolic Affairs and Signaling in Malignancy. *Front Oncol* 10: 231. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00231>
23. *Jacobo-Herrera NJ, Nacional I, Médicas C, Zubirán NS, Lisanti MP, Lang L, Manzo-Merino J, de La Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A* (2019) Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol* 9: 1143. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01143>
24. *Brooks GA, Arevalo JA, Osmond AD, Leija RG, Curl CC, Tovar AP* (2022) Lactate in contemporary biology: a phoenix risen. *J Physiol* 600(5): 1229–1251. <https://doi.org/10.1113/JP280955>
25. *Libre A, Grudzinska FS, O'Shea MK, Duffy D, Thickett DR, Mauro C, Scott A* (2021) Lactate crosstalk in host-pathogen interactions. *Biochem J* 478(17): 3157–3178. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210263>
26. *Coventry BJ, Henneberg M* (2021) The Immune System and Responses to Cancer: Coordinated Evolution. *F1000Res* 4: 552. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6718.3>
27. *Szekeress-Bartho J, Laszlo Kovacs G, Gabor Than N, Liao A-H, Ma L-N, Huang X-B, Muyayalo KP, Mor G* (2020) Lactic Acid: A Novel Signaling Molecule in Early Pregnancy? *Front Immunol* 11: 279. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00279>
28. *Wang JX, Choi SYC, Niu X, Kang N, Xue H, Killam J, Wang Y* Lactic Acid and an Acidic Tumor Microenvironment suppress Anticancer Immunity. *Mol Sci* 21(21): 8363. <https://doi.org/10.3390/ijms21218363>
29. *Wu H, Ding Z, Hu D, Sun F, Dai C, Xie J, Hu X* (2012) Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death. *J Pathol* 227(2): 189–199. <https://doi.org/10.1002/path.3978>
30. *Faubert B, Li KY, Cai L, Hensley CT, Kim J, Zacharias LG, Yang C, Do QN, Doucette S, Burguete D, Li H, Huet G, Yuan Q, Wigal T, Butt Y, Ni M, Torrealba J, Oliver D, Lenkinski RE, Malloy CR, Wachsmann JW, Young JD, Kernstine K, DeBerardinis RJ* (2017) Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell* 171(2): 358–371. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.019>
31. *Fan TWM, Lane AN, Higashi RM, Farag MA, Gao H, Bousamra M, Miller DM* (2009) Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by ¹³C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Mol Cancer* 8: 41. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-41>
32. *Bok R, Lee J, Sriram R, Keshari K, Sukumar S, Daneshmandi S, Korenchan DE, Flavell RR, Vigneron DB, Kurhanewicz J, Seth P* (2019) The role of lactate metabolism in prostate cancer progression and metastases revealed by dual-agent hyperpolarized ¹³C MRSI. *Cancers (Basel)* 11(2): 257. <https://doi.org/10.3390/cancers11020257>
33. *DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB* (2007) Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(49): 19345–19350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709747104>
34. *Pérez-Escuredo J, Dadhich RK, Dhup S, Cacace A, van Hée VF, de Saedeleer CJ, Sboarina M, Rodriguez F, Fontenille MJ, Brisson L, Porporato PE, Sonveaux P* (2016) Lactate promotes glutamine uptake and metabolism in oxidative cancer cells. *Cell Cycle* 15(1):72–83. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1120930>
35. *Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP* (2010) Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis. *Cell Cycle* 9(17): 3506–3514. <https://doi.org/10.4161/cc.9.17.12731>
36. *Shan T, Chen S, Chen X, Lin WR, Li W, Ma J, Wu T, Cui X, Ji H, Li Y, Kang Y* (2017) *Oncol Rep* 37(4): 1971–1979. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5479>
37. *Kimmelman AC, White E* (2017) Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metab* 25(5): 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.004>

38. *Jiang Y, Han Q, Zhao H, Zhang J* (2021) Promotion of epithelial-mesenchymal transformation by hepatocellular carcinoma-educated macrophages through Wnt2b/ β -catenin/c-Myc signaling and reprogramming glycolysis. *J Exp Clin Cancer Res* 40(1): 13.
<https://doi.org/10.1186/s13046-020-01808-3>
39. *Brown TP, Ganapathy V* (2020) Lactate/GPR81 signaling and proton motive force in cancer: Role in angiogenesis, immune escape, nutrition, and Warburg phenomenon. *Pharmacol Ther* 206: 107451.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107451>
40. *Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause SW, Kreutz M* (2007) Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109(9): 3812–3819.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-035972>
41. *Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP* (2013) Tumor-Derived Lactate Modifies Antitumor Immune Response: Effect on Myeloid-Derived Suppressor Cells and NK Cells. *J Immunol* 191(3): 1486–1495.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202702>
42. *Luo Y, Li L, Chen X, Gou H, Yan K, Xu Y* (2022) Effects of lactate in immunosuppression and inflammation: Progress and prospects. *Int Rev Immunol* 41(1): 19–29.
<https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1974856>
43. *Ivashkiv LB* (2020) The hypoxia-lactate axis tempers inflammation. *Nat Rev Immunol* 20(2): 85–86.
<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0259-8>
44. *Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ, Medzhitov R* (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 513 (7519): 559–563.
<https://doi.org/10.1038/nature13490>
45. *Sonveaux P, Copetti T, de Saedeleer CJ, Végran F, Verrax J, Kennedy KM, Moon EJ, Dhup S, Danhier P, Frérart F, Gallez B, Ribeiro A, Michiels C, Dewhirst MW, Feron O* (2012) Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One* 7(3): e33418.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033418>
46. *Manoharan I, Prasad PD, Thangaraju M, Manicassamy S* (2021) Lactate-Dependent Regulation of Immune Responses by Dendritic Cells and Macrophages. *Front Immunol* 12: 691134.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691134>
47. *Watson MLJ, Vignali PDA, Mullett SJ, Overacre-Delgoffe AE, Peralta RM, Grebinoski S, Menk A v., Rittenhouse NL, DePeaux K, Whetstone RD, Vignali DAA, Hand TW, Poholek AC, Morrison BM, Rothstein JD, Wendell SG, Delgoffe GM* (2021) Metabolic support of tumour-infiltrating regulatory T cells by lactic acid. *Nature* 591(7851): 645–651.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-03045-2>
48. *Feng J, Yang H, Zhang Y, Wei H, Zhu Z, Zhu B, Yang M, Cao W, Wang L, Wu Z* (2017) Tumor cell-derived lactate induces TAZ-dependent upregulation of PD-L1 through GPR81 in human lung cancer cells. *Oncogene* 36(42): 5829–5839.
<https://doi.org/10.1038/onc.2017.188>
49. *Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, Chow CCT, Harada H* (2019) HIF-1-dependent reprogramming of glucose metabolic pathway of cancer cells and its therapeutic significance. *Int J Mol Sci* 20(2): 238.
<https://doi.org/10.3390/ijms20020238>
50. *Baumann F, Leukel P, Doerfelt A, Beier CP, Dettmer K, Oefner PJ, Kastenberger M, Kreutz M, Nickl-Jockschat T, Bogdahn U, Bosserhoff AK, Hau P* (2009) Neurooncology Lactate promotes glioma migration by TGF- β 2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro Oncology* 11: 368–380.
<https://doi.org/10.1215/15228517-2008-106>
51. *Morrissey SM, Zhang F, Ding C, Montoya-Durango DE, Hu X, Yang C, Wang Z, Yuan F, Fox M, Zhang H ge, Guo H, Tieri D, Kong M, Watson CT, Mitchell RA, Zhang X, McMasters KM, Huang J, Yan J* (2021) Tumor-derived exosomes drive immunosuppressive macrophages in a pre-metastatic niche through glycolytic dominant metabolic reprogramming. *Cell Metab* 33(10): 2040–2058.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.09.002>
52. *Walenta S, Mueller-Klieser WF* (2004) Lactate: Mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol* 14(3): 267–274.
<https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2004.04.004>
53. *Nadege B, Patrice L, Rodrigue R* (2009) Mitochondria: From bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front Biosci* 14(11): 4015–4034.
<https://doi.org/10.2741/3509>

54. Lu H, Forbes RA, Verma A (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277(26): 23111–23115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202487200>
55. Ge H, Weiszmann J, Reagan JD, Gupte J, Baribault H, Gyuris T, Chen JL, Tian H, Li Y (2008) Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81. *J Lipid Res* 49(4): 797–803. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700513-JLR200>
56. Roland CL, Arumugam T, Deng D, Liu SH, Philip B, Gomez S, Burns WR, Ramachandran V, Wang H, Cruz-Monserrate Z, Logsdon CD Tumor and Stem Cell Biology Cell Surface Lactate Receptor GPR81 Is Crucial for Cancer Cell Survival. *Cancer Res* 74(18): 5301–5310. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0319>
57. Ishihara S, Hata K, Hirose K, Okui T, Toyosawa S, Uzawa N, Nishimura R, Yoneda T (2022) The lactate sensor GPR81 regulates glycolysis and tumor growth of breast cancer. *Scient Rep* 12: 6261. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10143-w>
58. Lee YJ, Shin KJ, Park SA, Park KS, Park S, Heo K, Seo YK, Noh DY, Ryu SH, Suh PG (2016) Supplementary Materials 2016 G-protein-coupled receptor 81 promotes a malignant phenotype in breast cancer through angiogenic factor secretion. *Oncotarget* 7(43):70898–70911. <https://doi.org/10.18632/oncotarget>
59. Feng J, Yang H, Zhang Y, Wei H, Zhu Z, Zhu B, Yang M, Cao W, Wang L, Wu Z (2017) Tumor cell-derived lactate induces TAZ-dependent upregulation of PD-L1 through GPR81 in human lung cancer cells. *Oncogene* 36: 5829–5839. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.188>
60. Wagner W, Kania KD, Ciszewski WM (2017) Stimulation of lactate receptor (HCAR1) affects cellular DNA repair capacity. *DNA Repair (Amst)* 52: 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.02.007>
61. Xie Q, Zhu Z, He Y, Zhang Z, Zhang Y, Wang Y, Luo J, Peng T, Cheng F, Gao J, Cao Y, Wei H, Wu Z (2020) A lactate-induced Snail/STAT3 pathway drives GPR81 expression in lung cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866(1): 165576. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165576>
62. Cai TQ, Ren N, Jin L, Cheng K, Kash S, Chen R, Wright SD, Taggart AK, Waters MG (2008) Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 377(3): 987–991. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.088>
63. Hunt TK, Aslam RS, Beckert S, Wagner S, Ghani QP, Hussain MZ, Roy S, Sen CK (2007) Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 9(8): 1115–1124. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1674>
64. San-Millán I, Brooks GA (2017) Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis* 38: 119–133. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw127>
65. Morland C, Andersson KA, Haugen ØP, Hadzic A, Kleppa L, Gille A, Rinholm JE, Palibrk V, Diget EH, Kennedy LH, Stølen T, Hennesstad E, Moldestad O, Cai Y, Puchades M, Offermanns S, Vervaeke K, Bjørås M, Wisløff U, Storm-Mathisen J, Bergersen LH (2017) Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nat Commun* 8: 15557. <https://doi.org/10.1038/ncomms15557>
66. Brooks GA (2002) Lactate shuttles in nature. *Biochem Soc Trans* 30(2): 258–264. <https://doi.org/10.1042/bst0300258>
67. Ranganathan P, Shanmugam A, Swafford D, Suryawanshi A, Bhattacharjee P, Hussein MS, Koni PA, Prasad PD, Kurago ZB, Thangaraju M, Ganapathy V, Manicassamy S (2018) GPR81, a Cell-Surface Receptor for Lactate, Regulates Intestinal Homeostasis and Protects Mice from Experimental Colitis. *J Immunol* 200(5): 1781–1789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700604>
68. Boitsova EB, Morgun AV, Osipova ED, Pozhilenkova EA, Martinova GP, Frolova OV, Olovannikova RY, Tohidpour A, Gorina YV, Panina YA, Salmina AB (2018) The inhibitory effect of LPS on the expression of GPR81 lactate receptor in blood-brain barrier model in vitro. *J Neuroinflammation* 15(1): 196. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1233-2>
69. Madaan A, Nadeau-Vallée M, Rivera JC, Obari D, Hou X, Sierra EM, Girard S, Olson DM, Chemtob S (2017) Lactate produced during labor modulates uterine inflammation via GPR81 (HCA1). *Am J Obstet Gynecol* 216(1): 60.e1–60.e17. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.09.072>
70. Beckert S, Farrahi F, Aslam RS, Scheuenstuhl H, Königsrainer A, Hussain MZ, Hunt TK (2006) Lactate stimulates endothelial cell migration. *Wound Repair and Regeneration* 14(3): 321–324. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00127.x>

71. Wagner S, Hussain MZ, Beckert S, Ghani QP, Weinreich J, Hunt TK, Becker HD, Königsrainer A (2007) Lactate down-regulates cellular poly(ADP-ribose) formation in cultured human skin fibroblasts. *Eur J Clin Invest* 37(2): 134–139.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01760.x>
72. Shatova O, Khomutov E, Zynkovich I, Skorobogatova Z, Bogaturova O (2009) Does lactate have an impact on enzyme activity? *Eur J Cancer Suppl* 7 (2): 100.
[https://doi.org/10.1016/s1359-6349\(09\)70339-8](https://doi.org/10.1016/s1359-6349(09)70339-8)
73. Shatova OP, Butenko EV, Khomutov EV, Kaplun DS, Sedakov IE, Zinkovych II (2016) Metformin impact on purine metabolism in breast cancer. *Biomed Khimiya* 62(3): 302–305.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20166203302>
74. Lee JW, Ko J, Ju C, Eltzschig HK (2019) Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Exp Mol Med* 5(6): 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s12276-019-0235-1>
75. Hellstrom KE, Hellstrom I (2019) From the Hellstrom paradox toward cancer cure. *Progr Mol Biol and Translat Sci* 164: 1–24.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.11.002>
76. Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ (1996) The Effect of Hyperglycemia on Cerebral Metabolism During Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(5): 1026–1033.
<https://doi.org/10.1097/00004647-199609000-00028>
77. van Gemert LA, Bastiaan, de Galan E, Wevers RA, Rob Ter Heine, Michèl, Willemsen A, de Galan BE, Willemsen MA (2022) Lactate infusion as therapeutical intervention: a scoping review Keywords Sodium lactate. Brain energy metabolism · Therapeutic lactate infusion. Review. *Eur J Pediatr* 181: 2227–2235.
<https://doi.org/10.1007/s00431-022-04446-3>
78. Sobieski C, Warikoo N, Shu H-J, Mennerick S (2018) Ambient but not local lactate underlies neuronal tolerance to prolonged glucose deprivation. *PLoS One* 13(4): e0195520.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195520>
79. Brooks GA (2001) Lactate doesn't necessarily cause fatigue: why are we surprised? *J Physiol* 536 (Pt 1): 1.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00001.x>
80. Cairns SP (2006) Lactic Acid and Exercise Performance Culprit or Friend? *Sports Med* 36(4): 279–291.
<https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00001>
81. Hallén J (1996) K⁺ balance in humans during exercise. *Acta Physiol Scand* 156(3): 279–286.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1996.187000>
82. Vincenzo De Paoli F, Overgaard K, Pedersen TH, Nielsen OB (2007) Additive protective effects of the addition of lactic acid and adrenaline on excitability and force in isolated rat skeletal muscle depressed by elevated extracellular K⁺. *J Physiol* 581: 829–839.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.129049>
83. Polunin G, Sedakov I, Borota O, Shatova O, Borota O (2013) The Influence of Sodium Lactate on Carbohydrates Metabolism in Patients with Inflammatory Bowel Diseases and Colon Cancer. *Ann Oncol* 24: iv116.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdt203.283>

Lactate: A New Look at the Role of an Evolutionarily Ancient Metabolite

O. P. Shatova^{a, d, *}, P. V. Shegay^b, A. A. Zabolotneva^a,
A. V. Shestopalov^{a, c}, and A. D. Kaprin^{b, d}

^aPirogov Russian National Research Medical University, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Moscow, Russia

^bNational Medical Research Radiology Center of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

^cDmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

^dRUDN University, Moscow, Russia

*e-mail: shatova.op@gmail.com

The article presents a new look at the role of lactate in the human body. It is shown that lactate has both positive and negative effects, which depend on its concentration. It was found that the concentration of lactate up to 15 mM is optimal for the implementation of the positive effects of this molecule. The positive effects of lactate include its participa-

tion in tissue regeneration, preservation of the integrity of neurons with a decrease in glucose levels, stimulation of adenosine catabolism and, as a result, a decrease in tumor immunosuppression, and provision of a stem cell phenotype. Negative effects for lactate are registered at its concentration above 15 mM. Negative effects include lactate activation of hyaluronic acid catabolism and extracellular matrix (ECM) remodeling, stimulation of tumor exosome formation, tumor cell proliferation, and suppression of the immune response. It is lactate that is the precursor for many metabolites of the tricarboxylic acid cycle (TCA) in tumors, some of which are oncometabolites. It is possible that hyperproduction of lactate by a tumor is not only a manifestation of aggression, but also an adaptive response from the cells of the tumor microenvironment, which thus regulates the functioning of target genes, causing a whole cascade of metabolic and physiological events.

Keywords: lactate, lactic acid, glycolysis, carcinogenesis, malignant tumors, evolutionary oncology

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОВРЕЖДАЮЩЕЙ
И ПРОТЕКТИВНОЙ ГИПОКСИИ МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2022 г. Д. Г. Семенов¹, *, А. В. Беляков¹, Е. А. Рыбникова¹

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

*E-mail: dsem50@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.09.2022 г.

После доработки 07.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

В настоящее время наблюдается новый всплеск интереса к проблеме гипоксии, почти утраченный в последние десятилетия. В связи с тем, что когорта компетентных специалистов в этой области существенно сократилась, необходимо осуществлять интенсивный обмен знаниями. С целью проинформировать широкий круг заинтересованных исследователей и врачей, в настоящем обзоре обобщено современное понимание гипоксии, ее патогенных и адаптогенных последствий, а также ключевых физиологических и молекулярных механизмов, которые реализуют реакцию на гипоксию на различных уровнях — от клеточного до организменного. В обзоре приведена современная классификация форм гипоксии, понимание которой необходимо для формирования научно обоснованного подхода к экспериментальному моделированию гипоксических состояний. Проведен анализ литературы, освещающий историю и современный уровень моделирования гипоксии в экспериментах на млекопитающих животных и человеке, в том числе способов создания умеренной гипоксии, применяемой для повышения резистентности нервной системы к тяжелым формам гипоксии и другим экстремальным факторам. Отдельное внимание уделяется обсуждению особенностей и ограничений различных подходов к созданию гипоксии, а также раскрытию потенциала практического применения умеренных гипоксических воздействий в лечебной и профилактической медицине.

Ключевые слова: гипоксия, классификация форм, экспериментальные модели гипоксии/ишемии, гипоксическая толерантность, мозг

DOI: 10.31857/S086981392212010X

Гипоксический фактор — один из ведущих в патогенезе сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний, занимающих первое место по распространенности и летальности среди других патологических состояний организма. При всем этиологическом разнообразии гипоксии и обширной классификации ее форм наиболее чувствительной мишенью ее пагубного воздействия является мозг. Соответственно, изучение механизмов и разработка новых способов повышения толерантности мозга к повреждающему действию гипоксии является одной из центральных проблем теоретической и прикладной физиологии, начиная с пионерских работ под руководством Л.А. Орбели и до наших дней. Можно выделить два основных подхода к решению этой проблемы. Первый заключается в использовании медикаментозных фармакологических средств (ноотропов, нейропротекторов, антигипоксантов, нейротрофинов и др). При этом следует признать, что молекулярные механизмы

воздействия многих существующих фармакологических препаратов недостаточно изучены, эффективность их действия не всегда высока, а побочные эффекты могут инициировать дополнительные патологические процессы. Второй подход базируется на использовании немедикаментозных средств, мобилизующих эндогенные, эволюционно приобретенные и генетически закрепленные защитные механизмы. В частности, к таким средствам относятся умеренные сублетальные гипоксические воздействия. Настоящий обзор демонстрирует эволюцию представлений о гипоксии, способах экспериментального моделирования различных ее форм, а также о механизмах как патогенных, так и адаптогенных ее последствий для организма в целом и особенно для центральной нервной системы. Авторы рассчитывают, что освещение этой неизменно актуальной темы послужит совершенствованию способов повышения резистентности мозга человека к повреждающим воздействиям.

ПОНЯТИЕ ГИПОКСИИ

Исследования, начатые еще в XIX веке, к 60-м годам XX века сформировали представления о гипоксии, как о важнейшем проявлении патологии тканей и клеток, вызываемом комплексом физических, химических и биологических факторов. К концу века сформировались представления не о патогенных, а об адаптогенных свойствах гипоксии умеренной силы, которую можно использовать в качестве прекодиционирующего (упреждающего, защитного) воздействия для снижения повреждающего эффекта последующей, более тяжелой формы гипоксии на мозг [1]. Главным патогенетическим элементом при гипоксии любой этиологии выступает не пониженный уровень кислорода как таковой, а ограничение возможности клетки производить достаточное количество макроэргических соединений для обеспечения комплекса своих эндергонических процессов (энергодифицит). В нервных клетках млекопитающих основная энергопродукция обеспечивается митохондриями в ходе окислительного фосфорилирования при деградации углеводов в цикле Кребса. При этом конечным акцептором электронов в цепи окислительно-восстановительного катаболизма глюкозы выступает O_2 . Таким образом, от организма требуется постоянная поставки субстрата (глюкозы) и конечного окислителя (кислорода) в клетки. Очевидно поэтому гипоксией часто называют состояние, связанное с дефицитом только O_2 , а ишемией называют гипоксию, усугубленную дефицитом глюкозы. Явление ишемии привлекает больший интерес исследователей, чем “чистая” гипоксическая гипоксия, поскольку оно чаще наблюдается в клинических ситуациях (инфаркт миокарда, инсульт, тромбозы, отеки, опухоли, черепно-мозговые травмы и т.п.). Наиболее уязвимыми в условиях гипоксии оказываются нервные клетки центральной нервной системы, поскольку их энергопотребление исключительно высоко, а запасы дыхательных субстратов в виде гликогена (как, например, в мышцах) крайне ограничены или отсутствуют. Кроме того, при гипоксии нейроны мозга, в отличие от клеток периферических тканей, не могут долго получать энергию за счет запуска процессов гликолиза [2]. В связи с этим при обсуждении механизмов гипоксического клеточного патогенеза и путей защиты от него имеют в виду в первую очередь нейроны головного мозга.

Поскольку функцию кислородно-субстратного снабжения клеток млекопитающих выполняет система кровообращения, то любые причины, ограничивающие переход кислорода из атмосферы в легкие, из альвеол в кровь, из крови в клетки и из цитозоля в митохондрии, а также причины, ограничивающие уровень глюкозы в крови и эффективность ее транспорта к митохондриям, вызывают развитие гипоксического (ишемического) состояния. “Доза” гипоксии или ишемии, т.е. степень и длительность кислородно-субстратного дефицита, определяет развитие в орга-

низме, тканях и клетках либо компенсаторно-приспособительных реакций, либо патогенеза, ведущего к гибели.

При выборе экспериментальной модели, позволяющей изучить эти процессы, следует учитывать указанное различие между гипоксическим и ишемическим состояниями. А именно тот факт, что во втором случае ограничение кислородного снабжения усугубляется не только гипогликемией, но и нарушением таких функций кровотока, как интегративная нейро-гуморальная сигнализация, транспорт метаболитов, водно-солевой обмен и пр.

ПАТОГЕННЫЕ И АДАПТОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ГИПОКСИИ

Первые изменения в организме при развитии гипоксии характеризуются включением комплекса компенсаторно-приспособительных реакций различного уровня, направленных на сохранение гомеостаза (*фаза компенсации*). В этой фазе различают реакции, направленные на приспособление к кратковременной острой гипоксии (*срочные*) и реакции, обеспечивающие устойчивое приспособление к менее выраженной, но длительно существующей или многократно повторяющейся гипоксии (*реакции долговременного приспособления*). Если эти реакции оказываются недостаточными, а гипоксические факторы продолжают действовать — в организме развиваются структурно-функциональные нарушения (*фаза декомпенсации*). Обе фазы проявляются на всех уровнях от организменного до клеточного. В основе срочных компенсаторных реакций организменного уровня на гипоксию лежит кардио-респираторный рефлекс, начинающийся с деполяризации O_2 — чувствительных клубочковых клеток каротидных телец, которая запускается митохондриальным сигналингом [3, 4]. Комплексный рефлекторный ответ выражается: в увеличении альвеолярной вентиляции за счет углубления и учащения дыхания и мобилизации резервных альвеол; в учащении сердечных сокращений; в выбросе крови из резервных кровяных депо; в увеличении ударного и минутного объема сердца; в повышении скорости кровотока (прежде всего — мозгового); в уменьшении кровоснабжения мышц, кожи и других “не критических” потребителей; в ограничении активности органов и тканей, непосредственно не участвующих в обеспечении транспорта кислорода [5].

В ответ на гипоксию повышается кислородная емкость крови за счет усиленного вымывания эритроцитов из костного мозга и активации эритропоэза; повышается кислородная емкость гемоглобина и облегчается его диссоциация в периферическом русле кровотока; повышается сопряженность процессов биологического окисления и фосфорилирования; усиливается анаэробный синтез АТФ за счет активации гликолиза; в различных тканях увеличивается продукция оксида азота, что ведет к расширению прекапиллярных сосудов и снижению адгезии и агрегации тромбоцитов [6].

Важной приспособительной реакцией при гипоксии является активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (стресс-синдром), гормоны которой (в частности, глюкокортикоиды) стимулируют различные внутриклеточные сигнальные системы, приводящие к экспрессии генов и их белковых продуктов, чья активность направлена на компенсацию энергодефицита, стимуляцию нейропластичности и сопротивление нейродегенеративным процессам [7, 8].

Если организменные и тканевые компенсаторные реакции не в состоянии противостоять продолжающейся и/или углубляющейся гипоксии/ишемии, в нервных клетках развивается деэнергизация, нарушающая гомеостатический баланс важнейших электрогенных и регуляторных катионов (K, Na, Ca), что приводит к деполяризации плазмолеммы и внутренних мембран; нарушается оборот глутамата в системе нейрон—глия и механизмы, контролирующие его рецепцию нейромембра-

нами. Это приводит к гипервозбуждению глутаматных рецепторов и развитию так называемого эксайтотоксикоза нейронов, сопровождающегося их перегрузкой внеклеточным Ca^{2+} . Рост концентрации внутриклеточного Ca^{2+} усугубляется его высвобождением из эндоплазматического ретикула и митохондрий, а также дополнительным входом через неспецифические катионовые каналы плазмолеммы. Активируются патогенные Ca^{2+} -зависимые фосфатазы и киназы, запускающие механизмы нейродегенерации. Патогенная ситуация усугубляется накоплением токсичных “неструктурированных” белков, гиперактивацией свободно-радикальных процессов, дезорганизацией митохондрий и другими молекулярными процессами, ведущим к гибели нейронов [9].

У человека острая гипоксия, вызванная, например, снижением содержания кислорода во вдыхаемом воздухе до уровня 15–10% или высотной гипобарией (преимущественно у альпинистов или пилотов), сопровождается отчетливыми нейропсихическими расстройствами. Проведено множество исследований таких расстройств, возникающих на умеренных, больших и экстремальных высотах. В условиях среднегорья обнаружено снижение точности и скорости двигательных реакций и психомоторной работоспособности, возникает изменение почерка и пропуск букв, снижаются пороги восприятия вкуса, запаха, боли. Нередко возникали эстетические иллюзии, эйфория и зрительные галлюцинации. На высотах от 6000 м происходят явные нарушения когнитивных функций. Снижаются показатели обучаемости, кратковременной памяти, речи, когнитивной гибкости, возникают признаки депрессии [10]. Между тем отмечено, что выраженность указанных расстройств зависит от личностного психотипа, рабочей мотивации, опыта и других индивидуальных психофизиологических характеристик. В условиях гипоксии эта специфика поддерживается паттерном регуляции локального мозгового кровотока, в которой важную роль играет сигналинг внутри системы нейроны–астроциты–микрососуды [11]. Психофизиологические нарушения начинают сопровождаться соматическими. В частности, компенсаторный механизм гипоксической легочной вазоконстрикции при углублении и продлении гипоксического состояния выступает причиной отека легких [12]. Гипоксическая тахикардия продолжает усиливаться, хотя амплитуда пульса снижается вплоть до нитевидного; возникает фибрилляция предсердий и желудочков. Систолическое давление после фазы компенсаторного подъема начинает падать [13].

КЛАССИФИКАЦИЯ ГИПОКСИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

Для выбора адекватной экспериментальной гипоксической модели на животных *in vivo* или на выделенных тканях и клетках (*ex vivo*, *in vitro*) необходимо учитывать реально возникающие гипоксические состояния, которые могут иметь различные причины и ход развития. В связи с этим важно охарактеризовать формы гипоксии, возникающие у людей в экстремальных ситуациях или в патологических состояниях. В отечественной медицинской литературе обычно используют классификацию, предложенную Сиротининым и Колчинской [14].

Одной из наиболее типичных форм гипоксии, по общепринятой классификации, считается гипоксия, связанная со снижением содержания O_2 во вдыхаемом воздухе, относящаяся к категории “экзогенных” и называемая гипоксической гипоксией. Две ее разновидности: гипобарическая и нормобарическая гипоксия.

Гипобарическая гипоксия. Это состояние возникает при понижении парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе, в условиях разреженной атмосферы. Оно может возникать при подъеме в горы (горная болезнь) или при разгерметизации (не герметичности) летательных аппаратов (высотная болезнь). При быстрой декомпрессии, с которой сталкивается летный состав, у человека развивается

симптомокомплекс дизбаризма, зависящий от высоты. На высоте 3000–4000 м происходит расширение газов и относительное увеличение их давления в замкнутых полостях тела (придаточные полости носа, лобные пазухи, полости среднего уха, плевральные полости, желудочно-кишечный тракт), что ведет к раздражению соответствующих рецепторов, вызывая резкие “высотные боли”; на высоте 9000 м развивается десатурация крови и газовая эмболия, приводящая к ишемии, нарушению зрения, вегето-сосудистым и психическим расстройствам; на высоте 19000 м ($pO_2 = 10$ мм Нг) и более возникает “кипение” в жидких средах, приводящее к тканевой и подкожной эмфиземе. Хроническая форма гипобарической гипоксии или горная болезнь развивается при относительно медленном подъеме и длительном пребывании на высотах свыше 5000 м. При поэтапном подъеме к этому уровню и длительных экспозициях на промежуточных высотах организм человека успевает активировать компенсаторные и адаптивные механизмы, закрепление которых приводит к акклиматизации.

Нормобарическая гипоксия. Эта форма развивается в тех случаях, когда понижена лишь концентрация кислорода во вдыхаемом воздухе. Обычно это происходит при неисправностях искусственных систем кислородного обеспечения, применяемых в летательных аппаратах, подводных лодках, горнодобывающих шахтах, тесных помещениях, клинических стационарах и т.д. В случае снижения концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе ниже 8% (при норме 21–22%) в организме возникает состояние, сходное с горной болезнью на высоте 7500–8000 м.

Несколько форм гипоксии, объединяемых понятием “эндогенные”, связаны с различными затруднениями доставки O_2 тканям и его утилизации в механизмах биологического дыхания.

Респираторная гипоксия. Форма гипоксии, связанной с нарушениями усвоения кислорода системой альвеолы–кровь. Она возникает в связи с затруднениями доставки и/или диффузии кислорода из альвеол в капилляры (болезни легких, трахеи, бронхов; нарушение функции дыхательного центра; пневмоторакс; воспаление, эмфизема, асбестоз легких; механические препятствия для поступления воздуха). Респираторная гипоксия обычно сочетается с гиперкапнией. Гипоксические состояния указанных выше форм условно разделяют по степени их тяжести. В основе этой градации лежит величина напряжения кислорода в артериальной крови, которая в норме составляет 90–100 мм Нг. *Легкая гипоксия* характеризуется снижением pO_2 до 60–50 мм Нг, *средняя* – до 50–40 мм Нг, *тяжелая* до 40–20 мм Нг и *крайне тяжелая* – ниже 20 мм Нг.

Циркуляторная (ишемическая) гипоксия. Гипоксическое состояние, связанное с нарушениями системы кровообращения, приводящими к недостаточному снабжению органов и тканей кислородом и глюкозой. Важнейший показатель ее развития – уменьшение минутного объема крови. Причинами циркуляторной гипоксии всего организма могут быть расстройство сердечной деятельности (инфаркт, кардиосклероз, перегрузка сердца, нарушения нейрогуморальной регуляции функции сердца) или гиповолемия из-за массивной кровопотери. Ишемия мозга возникает в результате склероза, тромбоза или разрыва мозговых сосудов. Признаком ишемической гипоксии является сниженное напряжение кислорода в венозной крови при нормальном его содержании в артериальной (высокая артериовенозная разница по кислороду).

Гемическая гипоксия. Форма гипоксии, связанной с патологией крови, приводящей к снижению ее кислородной емкости. Причинами выступают: анемия (снижение содержания гемоглобина в крови) или нарушение способности гемоглобина связывать, транспортировать и отдавать тканям кислород (образование карбоксигемоглобина, метгемоглобина, генетические аномалии гемоглобина). Признак ге-

мической гипоксии – снижение содержания кислорода и в артериальной, и в венозной крови.

Тканевая (цитотоксическая) гипоксия. Форма гипоксии, связанная с угнетением энергопродукции митохондрий. К этому типу относят состояния, при которых происходит: (а) вызванное токсинами снижение активности дыхательных ферментов или их синтеза; (б) гибель или структурные аномалии митохондрий; (в) разобщение процессов биологического окисления и фосфорилирования, при котором потребление кислорода тканями не снижается или может возрасти, но продукция макроэргов недостаточна для покрытия их энергетических потребностей. Признаком тканевой гипоксии является повышение содержания кислорода в венозной крови (низкая артерио-венозная разница по кислороду).

Субстратная (гипогликемическая) гипоксия. Форма, вызываемая недостатком глюкозы как субстрата клеточного дыхания. Это состояние возникает при первичном дефиците глюкозы, приводящем к нарушению всех звеньев биологического окисления. Субстратная гипоксия обычно возникает при расстройствах углеводного обмена (сахарный диабет и др.), а также при тяжелом голодании.

Перегрузочная гипоксия. Особая форма гипоксии, вызванная чрезмерной потребностью в энергии. Такое состояние возникает при напряженной деятельности органа или ткани, когда функциональные резервы систем транспорта и утилизации кислорода при отсутствии в них патологических изменений оказываются недостаточными для обеспечения резко увеличенной потребности в кислороде (чрезмерная мышечная работа, перегрузка сердца). Признаком перегрузочной гипоксии является феномен “кислородного долга”, т.е. развитие венозной гипоксемии и гиперкапнии при увеличении скорости доставки и потребления кислорода.

Гипоксические состояния человека иногда классифицируют по скорости нарастания и протекания. *Молниеносная гипоксия* может возникать при разгерметизации высотных летательных аппаратов и развивается в течение секунд. *Острая гипоксия*, возникающая при высотной болезни, асфиксии или обильной кровопотери, развивается в течение минут. *Подострая гипоксия* развивается в течение часов, дней или недель. Этот вид наблюдается при непродолжительном пребывании в условиях высокогорья, при острой пневмонии или острой сердечной, или дыхательной недостаточности. *Хроническая гипоксия* может тянуться месяцами и годами. Это состояние характерно для длительного пребывания в высокогорье или при некоторых хронических заболеваниях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ГИПОКСИИ

В экспериментальной практике используется множество моделей гипоксии, применяемых на животных (чаще на грызунах) с целью имитации и исследования патологических или адаптивных механизмов, инициируемых у человека гипоксиями различных форм и доз. Относительно безопасные формы и дозы гипоксии применяют на приматах и испытуемых людях. Обычно это дозированные воздействия гипоксической или перегрузочной гипоксии. Для исследования на животных используют две основные группы экспериментальных гипоксических моделей. В первой – гипоксическое воздействие предъявляется интактному или наркотизированному животному (гипоксия *in vivo*). Эта группа моделей позволяет имитировать патофизиологию человека, производить относительно длительное наблюдение за подопытным животным, оценивать системные и отдаленные эффекты гипоксии, наконец, это необходимый исследовательский этап перед началом клинических испытаний. Во второй группе гипоксические условия создаются *in vitro* выделенному и инкубируемому участку ткани или клеточной культуре. На таких моделях можно исследовать клетки человеческого происхождения, учитывать функциональную

специфику клеток разного типа, выявлять гипоксическую реактивность отдельных внутриклеточных сигнальных систем и применять геномную редакцию, что в целом формирует большой объем данных. Наконец, они легче поддаются стандартизации, автоматизации и позволяют преодолеть этические ограничения. Между тем для каждой группы моделей установлен список ограничений не менее обширный, чем преимуществ [15].

Следует отметить, что каждой модели соответствует своя техническая или хирургическая процедура и произвольно выбираемый экспериментальный протокол. В нем предусматривается, прежде всего, доза гипоксии. Часто гипоксии умеренной дозы применяются и исследуются как адаптогенные стимулы, повышающие резистентность тканей и клеток к повреждающим воздействиям, в том числе гипоксическим. Если такая гипоксия используется как “упреждающая” процедура, за которой следует тяжелая гипоксия или иное воздействие, известное как патогенное, говорят о *гипоксическом прекондиционировании*. Если же она применяется как “лечебное” средство после патологического воздействия, ее называют *посткондиционирующей* [16]. Некоторые исследователи, применяющие комбинацию этих форм, вводят термин *перикондиционирование* [17]. Модели тяжелой гипоксии могут воспроизводить или временное, или необратимое гипоксическое состояние. Первую парадигму называют *гипоксия/реоксигенация* или *ишемия/реперфузия*. Вторая схема относится к терминальным (летальным) воздействиям и нацелена на исследование механизмов гибели клеток.

Модификацией гипоксических моделей можно считать применение серии кратковременных гипоксий, чередующихся с периодами реоксигенации или гипероксигенации. В зависимости от частоты чередования и количества процедур в серии такую схему называют либо *интервальной (repetitive hypoxia)*, либо *прерывистой (intermittent hypoxia)*. Впрочем, эти термины не всеми четко разделяются [18].

Модели гипоксии in vivo

Модель глобальной ишемии мозга. Модели этого типа призваны имитировать ишемию всего мозга, которая может возникать при ситуациях, ограничивающих (останавливающих) кровотоки в магистральных артериях. Глобальная ишемия мозга экспериментального животного достигается остановкой сердца или блокадой мозгового кровотока. На крысах применяют классическую модель полной ишемии мозга: “4-сосудистая окклюзия”, при которой сначала коагулируют обе позвоночные артерии, а через день временно перекрывают кровотоки в сонных артериях [19]. На монгольской песчанке можно применять “2-сосудистую окклюзию сонных артерий”, поскольку у этого вида Велизиев круг не замкнут и данной меры достаточно, чтобы лишить кровоснабжения весь головной мозг [20]. При использовании мышей или крыс 2-сосудистую окклюзию следует сопровождать снижением общего артериального давления [21]. На моделях ишемии–реперфузии помимо исследования патологических процессов, развивающихся после восстановления кровоснабжения мозга, можно исследовать механизмы развития клеточной толерантности к гипоксии.

Модели глобальной гипоксической гипоксии. В зависимости от контекста исследования, эти модели могут применяться в остром или хроническом эксперименте. В остром эксперименте с наркотизацией, миорелаксацией и искусственной вентиляцией легких целесообразно использовать дыхательные газовые гипоксические смеси или останавливать искусственную вентиляцию (аноксия). В частности, интересные результаты дала модель “живого препарата” коры мозга наркотизированной кошки или кролика, разработанная в 70-е годы Самойловым и Семеновым и никем не повторенная [22, 23]. Специальной нейрохирургической операцией ча-

стично выделялся участок сенсо-моторной коры мозга с сохранным кровоснабжением через пиальную оболочку, который поворачивался под углом 90° так, чтобы поверхность поперечного разреза становилась доступной для контактной микроскопии и применения микроэлектродов для регистрации биоэлектрической активности или напряжения кислорода. При этом введение витальных красителей в омывающий раствор позволяло наблюдать отдельные нейроны и измерять в них динамику окислительно-восстановительных процессов, а также проявления нарушений кальциевого обмена в ходе аноксической и постаноксической экспозиции животного различной длительности. Доза гипоксического воздействия при этом определяется исключительно длительностью экспозиции. Очевидным ограничением таких моделей является артефактное влияние наркоза и миорелаксации, невозможность исследования отсроченных процессов реоксигенации и другие факторы острого эксперимента.

Менее сложными и более воспроизводимыми представляются популярные модели на интактных животных, помещенных в специальные камеры, в хроническом эксперименте. При этом применима как нормобарическая, так и гипобарическая гипоксии. Для первой доза определяется процентной долей кислорода, а для второй – степенью разрежения воздуха. Выбирается также определенная экспозиция, их число и временной интервал между ними. Это существенно повышает вариативность параметров, определяющих эффект гипоксии. Впрочем, этот эффект может быть оценен либо *in vivo* поведенческими методами при реоксигенации, либо гистохимическими исследованиями образцов *post mortem*.

Нормобарическое воздействие обычно применяют к взрослым животным (мыши или крысы), помещенным в камеру, которая продувается газовой смесью, обедненной кислородом (иногда до 5–8%) в течение 1–5 ч. Материал для анализа забирают на различных сроках гипоксии или реоксигенации. Исследования постгипоксической динамики нескольких нелинейно меняющихся характеристик (например, экспрессии генов), требуют забора материала с коротким временным шагом (5–6 точек в интервале от 1 до 24 ч реоксигенации) [24]. Помимо изучения патогенного эффекта гипоксии, этот подход часто применяют, в том числе на людях, при исследовании нейропротективного эффекта повторяющихся умеренных гипоксий или гипоксической тренировки. В этом случае газовая смесь в пределах 8–15% O₂ подается ежедневно с определенной длительностью сеанса. Может применяться смесь одного состава или в чередовании с иной гипоксической, нормоксической или гипероксической смесью [25].

При создании *гипобарической гипоксии* принимается во внимание тот факт, что большинство людей на Земле живет на высоте до 3000 м над уровнем моря, но 15 млн человек живут в полосе от 3000 до 4800 м. На высоте свыше 5500 м человек не может жить длительное время. В соответствии с этим в экспериментальных барокамерах для людей традиционно применяют две степени разрежения воздуха: либо на рубеже “среднегорья” и “высокогорья” т.е. 3000–4000 м (в качестве тренировочной, адаптирующей процедуры), либо свыше 7000–8000 м (кратковременно, как тест на эффективность антигипоксических мер). Следует отметить, что эти рубежи приняты для “среднестатистического” нетренированного по специальным методикам человека. Они различаются у отдельных популяций людей, имеют индивидуальные вариации, а также отличаются у людей, предварительно акклиматизированных к высоте или подвергнутых гипоксическим тренировкам. Кроме того, они специфичны и у разных видов млекопитающих, используемых в эксперименте.

Применительно к крысам в ряде исследований экспозиция на уровне тяжелой гипобарической гипоксии (ТГГ) – 7600 м производилась от 3 ч [26, 27]. После “спуска” обычно исследуют характеристики, выявляющие повреждающий эффект ТГГ, от геномного уровня до когнитивных функций. Более жесткое воздействие

ТГГ на крыс – 10000–11000 м без предварительной протекции и при достаточной длительности является заведомо летальным и служит в качестве контроля для применения прекодиционирующих нейропротективных процедур. В частности, перед ТГГ крысам создают серию умеренных, кратковременных ежедневных гипобарических воздействий (4000–5000 м), формирующих гипоксическую толерантность и ослабляющих или предотвращающих развитие патологии, вызываемой ТГГ. Промежуточный уровень гипобарической гипоксии (6000–6500 м) иногда применяют в форме многократных более или менее длительных сессий (прерывистая гипобарическая гипоксия). Могут применяться резкие, “импульсные” воздействия. Например, ежедневно по 1 сеансу длительностью 1 ч, в котором гипобария (6500 м) создается с экспозицией 1 мин через каждые 5 мин. В другом варианте при исследовании нарушений в уровнях моноаминов в различных отделах мозга крысы ежедневную гипобарию (5500 м) длительностью 8 ч создавали в течение недели [28].

Трансляционный потенциал моделей ТГГ невелик, и таких публикаций в открытой печати мало, поскольку проблемы, связанные с экстремальным альпинизмом, не имеют широкого распространения, а ситуации катастрофической разгерметизации относятся, обычно, к сфере военной авиационной медицины. Вместе с тем модели умеренных гипобарических воздействий широко используются на животных для исследования механизмов гипоксической/ишемической толерантности мозга [29].

Модели фокальной ишемии. В клинике наиболее часто сталкиваются с состояниями неполной (фокальной) ишемии мозга или инсультом. В англоязычной литературе такую ишемизацию ограниченного мозгового участка называют “*stroke*”. Одной из часто используемых моделей с 80–90-х годов выступает модель окклюзии средней мозговой артерии (*MCAo* – *middle cerebral artery occlusion*) [30]. Модель была предложена в 1986 г. [31] и затем несколько модернизирована [32]. В этой модели под наркозом обнажается область правой или левой каротидной артерии, наружная каротидная артерия перерезается и используется как вход в общую и внутреннюю каротидную артерию для введения упругой силиконизированной нити. Нить проводится через систему каротидных артерий так, чтобы попасть в среднюю мозговую артерию и перекрыть в ней кровоток. На крысах такую окклюзию создают обычно на 60–120 мин. Нить можно извлечь и восстановить перфузию [33]. При достаточной длительности окклюзии в реперфузируемой коре головного мозга через некоторое время развивается апоптотическая нейродегенерация. К недостаткам модели следует отнести частые случаи субарахноидальной геморрагии и негативные последствия ишемизации лицевых и челюстных областей головы, вызванных перекрытием наружной каротидной артерии. Вариантом *MCAo* выступает ее эмболизация. В этой технике вместо нити в среднюю мозговую артерию вводят раствор, содержащий силиконовые макросферы. Это позволяет ишемизировать менее обширные участки мозга и не повредить гипоталамус, что предотвращает ишемическую гипертермию [30]. Однако при этом способе невозможна реперфузия. Вариантом эмболической модели выступает остроумная фототромбозная модель фокальной ишемии, предложенная и разработанная в 70–80-е годы, которая использует явление локального фотоокисления специальных фоточувствительных красителей (например, Бенгальского розового) [34]. Краситель вводится внутривенно и распространяется по системе пиальных сосудов мозга. При фокусированном освещении коры мозга по стереотаксическим координатам через черепную кость можно вызвать локальное повреждение сосудистого эндотелия синглетным кислородом, активацию тромбоцитов и полную ишемизацию в зоне облучения. Эта модель минимально инвазивна, не требует наркоза и создает очень малую, “прицельно” выбранную область ишемизации. Впрочем, она имитирует лишь не-

обратимую ишемию и создает слишком малую область “теневого ишемизации” (*zona penumbra*). А между тем, именно эта зона, возникающая в естественных ситуациях инсульта в связи с активацией коллатерального кровоснабжения вокруг очага полной ишемии, характеризуется развитием определенного паттерна функциональных нарушений и представляет особый интерес для клиницистов. Для исследования механизмов гипоксической толерантности мозга используют комбинированные модели. Одна из них сочетает кратковременную прекондиционирующую фокальную ишемию и последующую (через 24 ч) тяжелую глобальную ишемию [35].

Несмотря на разнообразие моделей гипоксии/ишемии *in vivo*, применяемых на животных, до сих пор ни одна из них не может быть признана идеально имитирующей реальные клинические ситуации в мозге человека [36]. В связи с этим постоянно появляются новые модели и совершенствуются старые [37, 38].

Модели гипоксии, применяемые на людях. В силу понятных причин исследование гипоксических воздействий на человеке имеет ряд ограничений. Во-первых, исключается возможность анализа выделенных образцов тканей, и в распоряжении исследователя остается более или менее расширенный клинический анализ крови (определение уровней эритропоэтина, эритроцитов, ретикулоцитов, гемоглобина, гематокрита, растворимого трансферрин-рецептора и др. [39]), а также оценка общепатологических или психологических характеристик. Во-вторых, применяются относительно безопасные модели обратимого и четко дозируемого воздействия, которое может быть прервано в любой момент. Обычно такие модели сводятся к трем группам: нормобарическая, гипобарическая или перегрузочная гипоксия или их комбинации. В-третьих, выбор модели определяется практическими (профессиональными) задачами, подразумевающими сохранение работоспособности человека в гипоксической среде или при чрезмерных энергозатратах. Такие исследования часто проводят в спортивной или военной медицине. Следует отметить, что в силу известных этических и экономических причин, применение экспериментальной гипоксии к приматам как конечному объекту доклинических исследований, имеет почти те же ограничения, что и эксперименты на людях. Помимо изучения соматических эффектов гипоксии, особое внимание уделяется ее воздействию на когнитивные функции этих животных [40, 41].

Часть “человеческих” моделей направлена на имитацию постепенного развития гипоксии и длительного пребывания в гипоксических условиях (альпинизм, высокогорные тренировки). Для этих задач обычно проводят исследования и тренировки в условиях “среднегорья” (2500–4000 м) в течение 3–5 нед. [42]. Другие модели применяются для изучения острых форм гипоксии, развивающихся при резком и относительно кратковременном снижении уровня кислорода и/или кровоснабжения (разгерметизация летательных аппаратов, нарушения систем обеспечения в замкнутых пространствах, гравитационные перегрузки). Как и на животных, в этих моделях, во-первых, широко применяется принцип повторяющихся гипоксических воздействий с различной длительностью, числом и интервальностью экспозиций в серии и повторяемостью самих серий; во-вторых, с их помощью исследуют как патогенные, так и адаптогенные последствия.

Особая сфера применения адаптогенных гипоксических процедур на человеке отводится практической медицине (как профилактической, так и лечебной). Одной из распространенных схем в лечении ряда респираторных, кардиологических, аллергических и др. расстройств является модель многократно повторяющихся сеансов умеренной нормобарической гипокситерапии (10–30 сеансов в течение нескольких недель) [25]. Сеансы гипобаротерапии часто применяются для лечения бронхиальной астмы, гипопластической и железодефицитной анемии, хронического лейкоза, сердечно-сосудистых нарушений, гипертонической болезни, постинфарктного кардиосклероза, эндокринных заболеваний (тиреотоксикоз, сахар-

ный диабет), хронических воспалительных гинекологических заболеваний, неврастении и т.д. [43]. Недавно было показано, что интервальная гипобарическая гипоксия, сочетанная с физическими нагрузками, существенно облегчает реабилитацию пациентов, восстанавливающихся после COVID-19 [44]. В профилактическом плане (гипобаропротектика) гипобарию применяют к людям, имеющим факторы риска в быту или в профессиональной деятельности (избыточный вес, стрессорная обстановка, физические перегрузки, воздействие электромагнитных полей, необходимость повышения физических и психических характеристик работоспособности в экстремальных ситуациях).

Модель дистантной ишемии. Эта модель становится весьма популярной в последние годы в трансляционных исследованиях как нейропротективное воздействие в форме дистантного ишемического прекодиционирования (remote ischemic preconditioning – RIPC). Суть ее заключается в создании серии кратковременных ишемизаций/реперфузий периферических участков тела (обычно – конечностей). Такая процедура инициирует протективный феномен в жизненно важных органах, чьи функции нарушены стойкой ишемией/реперфузией. Доклинические исследования с применением RIPC указывают на протекцию от фокальной и глобальной ишемии/реперфузии мозга. Показано также, что кондиционирование дистантной ишемией задней конечности оказывает выраженное стресс-протективное, антидепрессант-подобное и анксиолитическое действие [45]. В поисках механизмов нейропротективного феномена RIPC исследуется участие HIF-1 α , окислительного стресса, глюкокортикоидных рецепторов, тромбоцитарного ответа, рецепторов аденозина A1, АМФ-активируемой протеинкиназы и др. Выявляются ранние и поздние фазы нейропротектирующего дистантного ишемического прекодиционирования и различия в их механизмах [45, 46].

Модели гипоксии *in vivo*, принятые в фармакологии. После оценки метаболизма и фармакокинетики лекарственных средств, проводимой обычно на каскаде моделей *in vitro*, переходят к оценке эффективности отобранного препарата-кандидата на моделях *in vivo*, сначала на грызунах, затем на более “высоких” видах (приматах). При последовательном использовании группы таких моделей определяется уровень безопасности препарата и степень побочного действия [47].

Исследуемый антигипоксикант обычно вводят подопытному животному подкожно или внутривенно курсом в течение 5 дней до предъявления гипоксического теста. Контрольная группа в том же режиме получает плацебо. Критерием успешного подбора фармпрепарата является достоверно повышенное качество восстановления функций при реоксигенации после гипоксического теста. В случаях применения летальных гипоксических воздействий (без реоксигенации) критерием эффективности препарата является увеличение времени жизни животных в условиях гипоксии по сравнению с выживаемостью тех, кто получал плацебо. При фармакологическом скрининге часто используют *острую нормобарическую гиперкапническую гипоксию*. Эта простая модель предусматривает помещение животного в герметичный сосуд малого объема, где, по мере потребления O₂ животным, его концентрация снижается, а концентрация CO₂ возрастает. Через некоторое время животное погибает [48]. *Острая гемическая гипоксия* создается с использованием подкожного введения нитрита натрия (NaNO₂) в дозе 150–250 мг/кг. Эта соль окисляет двухвалентное железо гемоглобина до трехвалентного. Образовавшийся метгемоглобин утрачивает способность обратимо связывать O₂, и развивается гемическая гипоксия [49]. На мышах и крысах применяется также *острая ТГГ* – однократный “подъем” в барокамере на высоту 11 000–12 000 м с высокой скоростью (около 30 м/с). При этом общее время достижения летального гипобарического плато составляет около 6 мин. Как и в случаях описанных моделей, критерием эф-

фektivности фармпрепарата является увеличение длительности жизни животных по сравнению с контролем [50]. При фармакологическом скрининге часто используются различные варианты описанной выше модели *фокальной ишемии мозга* с помощью необратимой МСАо [51, 52]. В ряде случаев на вторые сутки ишемии головного мозга оценивается психо-физиологическое состояние крыс в поведенческих тестах “Открытое поле” и “Приподнятый крестообразный лабиринт”. Затем после эвтаназии проводят гистохимическое и гистологическое исследование мозга. По классической методике для оценки уровня ишемизации применяют 0.5%-ный раствор Эванса голубого. Окрашенную ткань помещают в диметилсульфоксид для экстракции и спектрофотометрии красителя. Об обширности ишемического повреждения судят по интенсивности окраски экстракта в спектральной области 630 нм. Существует ряд методик с применением красителей, выявляющих на фиксированных гистологических препаратах мозга некротические или апоптотные нейроны. В гомогенатах мозга определяют биохимические показатели, характеризующие энергетический обмен (содержание лактата и пирувата, АТФ, АДФ и АМФ), состояние перекисного окисления липидов (содержание малонового диальдегида) и состояние антиоксидантной системы (активность супероксиддисмутазы и содержание восстановленного глутатиона).

Модели гипоксии ex vivo

Чтобы лучше понять молекулярные механизмы повреждения мозга при гипоксии/ишемии широко применяются модели *ex vivo*. В них транспортную функцию крови заменяют инкубационные среды, проточные или сменяемые. Были разработаны различные модели выделенных тканей мозга.

Фрагменты мозговой ткани молодых животных (для крыс возраст не более 1 недели) могут расти в инкубаторах и быть пригодными для эксперимента до месяца. Такая органотипическая культура ткани может создаваться из определенного участка мозга (например, гиппокамп, мозжечок, коры больших полушарий). Было доказано, что эта система относительно устойчиво воспроизводит постнатальное развитие мозга с установлением межнейронных связей и проявлением специфических физиологических и биохимических свойств [53]. Донорами для таких объектов могут быть мыши, крысы, морские свинки, кролики и эмбрион человека. Чаще выращивают культуру гиппокампа, т.к. он обладает четкими структурными и функциональными особенностями своих участков, среди которых зона CA1 с нейронами, высокочувствительными к гипоксии. Для имитации ишемии применяют замену оксигенированной питательной инкубационной среды раствором, лишенным кислорода и глюкозы (oxygen glucose deprivation – OGD) [54, 55]. Один из недостатков данной модели – это необходимость работать с тканью, находящейся в состоянии раннего онтогенеза и, следовательно, обладающей спецификой обменных и регуляторных процессов, свойственной весьма молодому организму. Другим возможным ограничением работы с культурами являются трудности с контролем напряжения кислорода в околоклеточном пространстве в “нормоксических” и, тем более, в “гипоксических” условиях. Несмотря на стандартные рекомендации для состава инкубата и окружающей атмосферы (18.6% O₂ и 5% CO₂), имеются существенные трудности в определении реального его состава вблизи отдельных клеток [56, 57]. Усматриваются как минимум две причины. Во-первых, специфика работы с культурами требует не проточной инкубации, а периодической сменяемости сред. При этом, по мере потребления клетками O₂, его содержание к моменту очередной смены может снижаться до “гипоксического” (по некоторым данным уже в течение часа). Во-вторых, клетки культуры в силу слипания и адгезии к подложке изначально в разной степени обеспечиваются кислородом из инкубата.

Борьба с этими недостатками модели требует применения сложных инкубационных систем и постоянного контроля рО₂ в различных микроучастках культуры [58].

При необходимости исследования “взрослой”, высококодифференцированной ткани применяют модель переживающих срезов, свежеприготовленных из мозга декапитированного животного (*acute slices*) [59]. На этом объекте можно создавать как OGD срезов гиппокампа [60, 61], так и нормогликемическую гипоксию различной глубины, вплоть до аноксии срезов коры [62, 63]. Эта модель имеет ряд преимуществ перед клеточными культурами уже потому, что предполагает проточную инкубационную среду. Кроме того, она позволяет наблюдать взаиморасположение и взаимодействия между функционально различными клетками выбранного объекта с использованием контактной или конфокальной микроскопии, биоиндикаторных красителей и микроэлектродной техники. Однако и такие модели имеют свои ограничения. “Взрослые” срезы трудно поддерживать в активном функциональном состоянии дольше суток, поэтому на них исследуют наиболее быстро развивающиеся последствия гипоксического воздействия. Кроме того, даже в тонких срезах (менее 300 мкм) кислород диффундирует из омывающего раствора с градиентом, падающим от поверхности к подложке. Для конфокальной микроскопии и спектрофлуориметрии ткани в таких условиях мало пригодны инвертированные микроскопы, поскольку в их рабочее “поле зрения” попадают прежде всего плохо омываемые нижние области среза. Применение же микроскопической техники с верхним расположением объектива создает конструктивные трудности для микроэлектродной техники.

Для обеих групп моделей *in vitro*, применяемых в гипоксических экспериментах, по-прежнему критическим ограничением является сложность в обеспечении “нормоксического” и “гипоксического” насыщения инкубационной среды кислородом, которое бы имитировало уровни реального кислородного обеспечения *in vivo*. Особенно остро эта проблема встает при необходимости быстрой смены одной среды на другую в моделях периодической гипоксии *in vitro*, имитирующей абструктивное сонное апноэ [64]. Для преодоления этих ограничений используют биореакторы, предварительно подготавливающие сменные среды для культуры и позволяющие производить их экспозицию в рамках десятков секунд [65]. Другую проблему технологии культур в открытых ячейках, а именно замедленную диффузию из окружающей газовой среды, отчасти удалось решить применением кислородопроницаемых подложек на дне ячеек. При этом колебания кислорода в газовой фазе становятся напрямую доступны клеткам и приклеточной жидкой среде во всем объеме препарата [66].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенные в обзоре сведения позволяют заключить, что к настоящему времени разработан широкий арсенал различных подходов и способов моделирования гипоксических состояний в экспериментах на млекопитающих животных и человеке. Проведение исследований с использованием этих моделей позволит в значительной мере раскрыть высокий потенциал умеренных гипоксических воздействий для медицины, спорта, экстремального туризма, а также подготовки работников, чья трудовая деятельность связана с риском экспозиции повреждающим факторам, в том числе в авиакосмической отрасли.

Судя по накопленным данным, предоставляемым различными моделями экспериментальной гипоксии, применение гипоксического кондиционирования, стимулирующего эволюционно древние механизмы гипоксической/ишемической толерантности мозга млекопитающих, представляется важным немедикаментозным компонентом превентивной и терапевтической стратегии для борьбы с нейродеге-

неративными, неврологическими и психическими заболеваниями человека, когнитивным дефицитом и преждевременным старением.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РНФ (проект № 22-25-00781).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Написание текста и оформление рукописи – Д.Г.С. Подбор литературы – Д.Г.С., А.В.Б., Е.А.Р. Идея обзора, редактирование текста, введение, заключение – Е.А.Р.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K (1990) “Ischemic tolerance” phenomenon found in the brain. *Brain Res* 528: 21–24.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90189-i](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90189-i)
2. Barros L, San Martín A, Ruminot I, Sandoval P, Baeza-Lehnert F, Arce-Molina R, Rauseo D, Contreras-Baeza Y, Galaz A, Valdivia S (2020) Fluid Brain Glycolysis: Limits, Speed, Location, Moonlighting, and the Fates of Glycogen and Lactate. *Neurochem Res* 45: 1328–1334.
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03005-2>
3. López-Barneo J, González-Rodríguez P, Gao L, Fernández-Agüera M, Pardo R, Ortega-Sáenz P (2016) Oxygen sensing by the carotid body: mechanisms and role in adaptation to hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol* 310: C629–C642.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00265.2015>
4. Lindsey B, Nuding S, Segers L, Morris K (2018) Carotid Bodies and the Integrated Cardiorespiratory Response to Hypoxia. *Physiology (Bethesda Md)* 33: 281–297.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00014.2018>
5. Dempsey J, Morgan B (2015) Humans In Hypoxia: A Conspiracy Of Maladaptation?! *Physiology (Bethesda Md)* 30: 304–316.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00007.2015>
6. Евсеева М, Евсеев А, Правдивцев В, Шабанов П (2008) Механизмы развития острой гипоксии и пути ее фармакологической коррекции. *Обзоры по клин фармакол и лекарств терапии* 6: 3–25. [Evseeva M, Evseev A, Pravdivtsev W, Shabanov P (2008) Mechanisms of development of acute hypoxia and its pharmacologic correction. *Rev Clin Pharmac and Drug Therap* 6: 3–25. (In Russ)].
7. Меерсон Ф (1993) Адаптация к стрессу: механизмы и защитные перекрестные эффекты. *Нур Мед J* 4: 23–30. [Meerson F (1993) Adaptation to stress: mechanisms and protective cross-effects. *Hyp Med J* 4: 23–30. (In Russ)].
8. Rybnikova E, Nalivaeva N (2021) Glucocorticoid-Dependent Mechanisms of Brain Tolerance to Hypoxia. *Int J Mol Sci* 22: 7982.
<https://doi.org/10.3390/ijms22157982>
9. Khoshnam S, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam H (2017) Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci* 38: 1167–1186.
<https://doi.org/10.1007/s10072-017-2938-1>
10. Virués-Ortega J, Buela-Casal G, Garrido E, Alcázar B (2004) Neuropsychological functioning associated with high-altitude exposure. *Neuropsychol Rev* 14: 197–224.
<https://doi.org/10.1007/s11065-004-8159-4>
11. Steinback C, Poulin M (2016) Influence of Hypoxia on Cerebral Blood Flow Regulation in Humans. *Adv Exp Med Biol* 903: 131–144.
https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7678-9_9
12. Dunham-Snary K, Wu D, Sykes E, Thakrar A, Parlow L, Mewburn J, Parlow J, Archer S (2017) Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: From Molecular Mechanisms to Medicine. *Chest* 151: 181–192.
<https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.09.001>

13. *Bilo G, Caravita S, Torlasco C, Parat G* (2019) Blood pressure at high altitude: physiology and clinical implications. *Kardiologia polska* 77: 596–603.
<https://doi.org/10.33963/KP.14832>
14. *Сиротинин Н* (1981) Эволюция резистентности и реактивности организма. Москва. Медицина. [*Sirotnin N* (1981) Evolution of resistance and reactivity of organism. Moscow. Meditsina. (In Russ)].
15. *Chazelas P, Steichen C, Favreau F, Trouillas P, Hannaert P, Thuillier R, Giraud S, Hauet T, Guillard J* (2021) Oxidative Stress Evaluation in Ischemia Reperfusion Models: Characteristics, Limits and Perspectives. *Int J Mol Sci* 22: 1–21.
<https://doi.org/10.3390/ijms22052366>
16. *Burda J, Burda R* (2021) Ischemic tolerance – blessing or curse. *Physiol Res* 70: 661–670.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.934644>
17. *Zhang Y, Cao Y, Liu C* (2020) Autophagy and Ischemic Stroke. *Adv Exp Med Biol* 1207: 111–134.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-4272-5_7
18. *Viscor G, Torrell, J R, Corral L, Ricart A, Javierre C, Pages T, Ventura J L* (2018) Physiological and Biological Responses to Short-Term Intermittent Hypobaric Hypoxia Exposure: From Sports and Mountain Medicine to New Biomedical Applications. *Front Physiol* 9: 814.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00814>
19. *Pulsinelli W, Brierley J* (1979) A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10: 267–272.
<https://doi.org/10.1161/01.str.10.3.267>
20. *Ito U, Hakamata Y, Yamaguchi T, Ohno K* (2013) Cerebral ischemia model using mongolian gerbils-comparison between unilateral and bilateral carotid occlusion models. *Acta Neurochir Suppl* 118: 17–21.
https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1434-6_3
21. *León-Moreno L, Castañeda-Arellano R, Rivas-Carrillo J, Dueñas-Jiménez S* (2020) Challenges and Improvements of Developing an Ischemia Mouse Model Through Bilateral Common Carotid Artery Occlusion. *J Stroke Cerebrovasc Diseases* 29: 104773.
<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104773>
22. *Семенов Д, Лазаревич Е, Самойлов М* (1988) Изменения обмена кальция в структурах коры головного мозга при аноксии. *Бюл эксп биол мед* 105: 261–264. [*Semenov D, Lazarewicz J, Samoilov M* (1988) The changes in calcium metabolism in brain structures during anoxia. *Bull Exp Biol Med* 105: 261–264. (In Russ)].
23. *Самойлов М* (1999) Мозг и адаптация. Молекулярно-клеточные механизмы. СПб. ИФРАН. [*Samoilov M* (1999) Brain and adaptation. Molecular-cellular Mechanisms. Spb. IFRAN. (In Russ)].
24. *Xu H, Lu A, Sharp F* (2011) Regional genome transcriptional response of adult mouse brain to hypoxia. *BMC Genomics* 12: 499–515.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-499>
25. *Цыганова ТН* (2019) Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка – обоснование создания нового поколения гипоксикатора гипо-окси-1 (обзорная статья). *Рос журн реабил мед* 1: 46–66. [*Tsyganova TN* (2019) Normobaric interval hypoxic training – rationale for creating a new generation of the hypoxicator hypo-oxy-1 (review article). *Russ J Rehab Med* 1: 46–66. (In Russ)].
26. *Sharma N, Sethy N, Bhargava K* (2013) Comparative proteome analysis reveals differential regulation of glycolytic and antioxidant enzymes in cortex and hippocampus exposed to short-term hypobaric hypoxia. *J Proteomics* 79: 277–298.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.020>
27. *Kauser H, Sahu S, Kumar S, Panjwani U* (2013) Guanfacine is an effective countermeasure for hypobaric hypoxia – induced cognitive decline. *Neuroscience* 254:110–119.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.023>
28. *Goswami AR, Dutta G, Ghosh T* (2016) Naproxen, a Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug, Can Affect Daily Hypobaric Hypoxia-Induced Alterations of Monoamine Levels in Different Areas of the Brain in Male Rats. *High Altitude Med Biol* 17: 133–140.
<https://doi.org/10.1089/ham.2015.0052>
29. *Rybnikova E, Vorobyev M, Pivina S, Samoilov M* (2012) Postconditioning by mild hypoxic exposures reduces rat brain injury caused by severe hypoxia. *Neurosci Lett* 513: 100–105.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.019>
30. *Carmichael T* (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism and purpose. *NeuroRx* 2: 396–409.
<https://doi.org/10.1602/neurorx.2.3.396>

31. *Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G* (1986) Experimental studies of ischemic brain edema. A new experimental model of cerebral embolism in which recirculation can introduced into the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8: 108–118.
32. *Belayev L, Alonso O, Busto R, Zhao W, Ginsberg M* (1996) Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 27: 1616–1622.
<https://doi.org/10.1161/01.str.27.9.1616>
33. *Takagi K, Zhao W, Busto R, Ginsberg M* (1995) Local hemodynamic changes during transient middle cerebral artery occlusion and recirculation in the rat: a [¹⁴C]iodoantipyrine autoradiographic study. *Brain Res* 691: 160–168.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00657-c](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00657-c)
34. *Labat-gest V, Tomasi S* (2013) Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies. *J Visual Exp: JoVE* 76: 1–6. 50370.
<https://doi.org/10.3791/50370>
35. *Glazier S, O'Rourke D, Graham D, Welsh F* (1994) Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 545–554.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.68>
36. *Hossmann K-A* (2008) Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 55: 257–270.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.12.004>
37. *Sommer C* (2017) Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133: 245–261.
<https://doi.org/10.1007/s00401-017-1667-0>
38. *Johnson S, Dwivedi A, Mirza M, McCarthy R, Gilvarry M* (2022) Review of the Advancements in the in-vitro Modelling of Acute Ischemic Stroke and Its Treatment. *Front Med Technol* 4: 879074.
<https://doi.org/10.3389/fmedt.2022.879074>
39. *Stray-Gundersen J, Chapman R, Levine B* (2001) “Living high, training low” altitude training improves sea level performance in male and female elite runners. *J Appl Physiol* 91: 1113–1120.
<https://doi.org/10.1152/jap.2001.91.3.1113>
40. *Беляков А, Семенов Д* (2018) Стимуляция когнитивных способностей пожилых макак умеренной гипобарической гипоксией. *Успехи геронтол* 31: 966–972. [*Belyakov A, Semenov D* (2018) Stimulation of cognitive abilities in aged macaques by moderate hypobaric hypoxia. *Adv Geront* 31: 966–972. (In Russ)].
<https://www.researchgate.net/publication/331354909>
41. *Беляков А, Семенов Д* (2018) Опыт исследования и коррекции когнитивных функций макак. *Журн высш нервн деят им ИП Павлова* 68: 163–175. [*Belyakov A, Semenov D* (2018) The experience of investigation and correction of cognitive function of macaca mulatta. *Zhurn Viss Nerv Deyat im IP Pavlova* 68: 163–175. (In Russ)].
<https://doi.org/10.7868/S004446771802003X>
42. *Clarke C* (2006) Acute mountain sickness: medical problems associated with acute and subacute exposure to hypobaric hypoxia. *Postgrad Med J* 82: 748–753.
<https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.047662>
43. *Wright A* (2006) Medicine at high altitude. *Clin Med* 6: 604–608.
<https://doi.org/10.7861/clinmedicine.6-6-604>
44. *Trapé Á, Camacho-Cardenosa M, Camacho-Cardenosa A, Merellano-Navarro E, Rodrigues J, da Silva Lizzi E, Sorgi C, Papoti M, Brazo-Sayavera J* (2021) Effects of moderate-intensity intermittent hypoxic training on health outcomes of patients recovered from COVID-19: the AEROBICOVID study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 22: 534.
<https://doi.org/10.1186/s13063-021-05414-2>
45. *Baranova K* (2017) Remote ischemic conditioning of the brain: phenomena and mechanism. *Neurochem J* 11: 189–193.
<https://doi.org/10.1134/S1819712417030023>
46. *Sharma D, Maslov L, Singh N, Jaggi A* (2020) Remote ischemic preconditioning-induced neuroprotection in cerebral ischemia-reperfusion injury: Preclinical evidence and mechanisms. *Eur J Pharmacol* 883: 173380.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173380>
47. *Landucci E, Pellegrini-Giampietro D E, Facchinetti F* (2022). Experimental Models for Testing the Efficacy of Pharmacological Treatments for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Biomedicines* 10: 937.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10050937>
48. *Левченкова О, Новиков В, Марышева В* (2015) Влияние нового производного тиазолоин-дола на устойчивость организма к гипоксии в ранний и поздний периоды прекондици-

- онирования. Обзоры клин фармакол лекарств терапии 13: 52–55. [Levchenkova O, Novikov V, Marysheva V (2015) Influence of the new tiazoloindole derivative on organism resistance to hypoxia in the early and late periods of preconditioning. Rev Clin Pharmacol Drug Therap 13: 52–55. (In Russ)].
49. Hzhelots'kyi M, Panina L, Terlets'ka O, Koval'chuk S (2007) Functional and metabolic basis of sodium nitrite modulatory influence in the brain in hemic hypoxia. Fiziol Zh 53: 70–77. PMID: 17725046
 50. Li M, Wu L-Y, Zhao T, Wu K, Xiong L, Zhu L, Fan M (2011) The protective role of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) against acute hypobaric hypoxia. Cell Stress Chaper 16: 529–537. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0264-8>
 51. Stutzmann J, Mary V, Wahl F, Grosjean-Piot O, Uzan A, Pratt J (2002) Neuroprotective profile of enoxaparin, a low molecular weight heparin, in in vivo models of cerebral ischemia or traumatic brain injury in rats: a review. CNS Drug Rev 8: 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2002.tb00213.x>
 52. Hoffman G, Merchenhaler I, Zup S (2006) Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. Endocrine 29: 217–231. <https://doi.org/10.1385/endo:29:2:217>
 53. Gahwiler B, Capogna M, Debanne D, McKinney R, Thompson S (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. Trends Neurosci 20: 471–477. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01122-3](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01122-3)
 54. Vornov J, Tasker R, Coyle J (1994) Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. Stroke 25: 457–464. <https://doi.org/10.1161/01.str.25.2.457>
 55. Cimarosti H, Zamin L, Frozza R, Nassif M, Horn A, Tavares A, Netto A, Salbeogo C (2005) Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3beta. Neurochem Res 30: 191–199. <https://doi.org/10.1007/s11064-004-2441-y>
 56. Place TL, Domann FE, Case AJ (2017) Limitations of oxygen delivery to cells in culture: an underappreciated problem in basic and translational research. Free Radic Biol Med 113: 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003>
 57. Bordt EA (2018) The importance of controlling in vitro oxygen tension to accurately model in vivo neurophysiology. Neurotoxicology 66: 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.10.008>
 58. Pavlacky J, Polak J (2020) Technical Feasibility and Physiological Relevance of Hypoxic Cell Culture Models. Front Endocrinol 11: 1–15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00057>
 59. Whittingham T, Lust D, Passonneau J (1984) An in vitro model of ischemia: metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice. J Neurosci 4: 793–802. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.04-03-00793.1984>
 60. Tasca CI, Dal-Cim T, Cimarosti H (2015) In vitro oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death. Methods Mol Biol (Clifton, NJ) 1254: 197–210. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2152-2_15
 61. Pérez-Rodríguez D, Anunciabay-Soto B, Llorente I, Pérez-García C, Fernández-López A (2015) Hippocampus and cerebral cortex present a different autophagic response after oxygen and glucose deprivation in an ex vivo rat brain slice model. Neuropathol Appl Neurobiol 41: e68–e79. <https://doi.org/10.1111/nan.12152>
 62. Semenov D, Samoilo M, Łazarewicz J (2008) Preconditioning reduces hypoxia-evoked alterations in glutamatergic Ca²⁺ signaling in rat cortex. Acta Neurobiol Exp (Wars) 68: 169–179.
 63. Revah O, Lasser-Katz E, Fleidervish I, Gutnick M (2016) The earliest neuronal responses to hypoxia in the neocortical circuit are glutamate-dependent. Neurobiol Disease 95: 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.019>
 64. Hunyor J, Cook K (2018) Models of intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: molecular pathways and their contribution to cancer. Am J Physiol 315: R669–R687. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00036.2018>
 65. Tsapikouni T, Garreta E, Melo E, Navajas D, Farré R (2012) A bioreactor for subjecting cultured cells to fast-rate intermittent hypoxia. Respirat Physiol and Neurobiol 182: 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.01.001>
 66. Polak J, Studer-Rabeller K, McHugh H, Hussain MA, Shimoda LA (2015) System for exposing cultured cells to intermittent hypoxia utilizing gas permeable cultureware. Gen Physiol Biophys 34: 235–247. https://doi.org/10.4149/gpb_2014043

**Experimental Modeling of Damaging and Protective Hypoxia
of the Mammalian Brain****D. G. Semenov^{a, *}, A. V. Belyakov^a, and E. A. Rybnikova^a***^aPavlov Institute of Physiology of Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia***e-mail: dsem50@rambler.ru*

Currently, there is a new surge of interest in the problem of hypoxia, almost lost in recent decades. Due to the fact that the circle of competent specialists in this field has significantly narrowed, it is necessary to carry out an intensive exchange of knowledge. In order to inform a wide range of interested researchers and doctors, this review summarizes the current understanding of hypoxia, its pathogenic and adaptogenic consequences, as well as key physiological and molecular mechanisms that implement the response to hypoxia at various levels – from cellular to organismic. The review presents a modern classification of forms of hypoxia, the understanding of which is necessary for the formation of a scientifically based approach to experimental modeling of hypoxic states. An analysis of the literature covering the history and current level of hypoxia modeling in mammals and human experiments, including methods for creating moderate hypoxia used to increase the resistance of the nervous system to severe forms of hypoxia and other extreme factors, is carried out. Special attention is paid to the discussion of the features and limitations of various approaches to the creation of hypoxia, as well as the disclosure of the potential for the practical application of moderate hypoxic effects in medicine.

Keywords: hypoxia, classification of forms, experimental models of hypoxia/ischemia, hypoxic tolerance, brain

**TGN-020, ИНГИБИТОР ВОДНОГО КАНАЛА АКВАПОРИНА-4,
УСКОРЯЕТ ПРОЦЕСС НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ В НИГРОСТРИАТНОЙ
СИСТЕМЕ В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС**

© 2022 г. К. В. Лапшина¹ *, Ю. Ю. Абрамова¹, М. А. Гузеев¹, И. В. Екимова¹

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

*E-mail: ksenia.lapshina@gmail.com

Поступила в редакцию 29.09.2022 г.

После доработки 27.10.2022 г.

Принята к публикации 27.10.2022 г.

Водный канал аквапорин-4 (aquaporin-4, AQP-4) является важнейшим звеном в механизмах обеспечения водного гомеостаза в головном мозге и участником процесса “очистки” паренхимы мозга от различных метаболитов, в том числе — от амилоидогенных белков, способствующих развитию нейродегенеративных заболеваний. Задача настоящего исследования состояла в том, чтобы выяснить, какое влияние оказывает фармакологическое ингибирование водного канала AQP-4 в головном мозге на темп развития нейродегенерации и компенсаторные процессы в nigrostriatной системе в лактацистиновой модели болезни Паркинсона (БП) у крыс. Модель БП у самцов крыс популяции Вистар воспроизводили с помощью микроинъекций специфического ингибитора протеасом лактацистина в компактную часть черной субстанции (кчЧС). Для фармакологического подавления активности AQP-4 применяли ингибитор TGN-020, который вводили в ликвор бокового желудочка головного мозга. В работе применены методы иммуногистохимии и поведенческие тесты для оценки моторного дефицита. Созданная модель БП характеризовалась допороговым уровнем гибели дофаминергических нейронов в кчЧС (27%) и их аксонов в стриатуме (19%) по сравнению с уровнем клинической стадии, отсутствием изменений уровня ключевого фермента синтеза дофамина тирозингидроксилазы в нейронах кчЧС и моторной функции. Такие патофизиологические изменения характерны для доклинической стадии БП. Применение TGN-020 в модели БП ускоряло переход из доклинической в клиническую стадию БП, о чем свидетельствовало прогрессирование нейродегенерации в nigrostriatной системе, ослабление компенсаторных процессов и развитие симптомов паркинсонизма. Полученные данные указывают, что AQP-4 играет важную роль в молекулярных механизмах, обеспечивающих защиту мозга от нейротоксических факторов, и снижение его активности может приводить к нарушению функционирования лимфатической системы. Водный канал AQP-4 может оказаться перспективной терапевтической мишенью для нейропротекции при БП и других нейродегенеративных заболеваниях.

Ключевые слова: аквапорин-4, убиквитин-протеасомная система, лимфатическая система, болезнь Паркинсона, нейродегенерация, тирозингидроксилаза, моторная дисфункция

DOI: 10.31857/S0869813922120081

Болезнь Паркинсона (БП) — это хроническое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание. Ключевым патогенетическим признаком БП является гибель более половины популяции дофамин (ДА)-ергических нейронов в компактной части черной субстанции (кЧС) головного мозга, что приводит к снижению уровня ДА в стриатуме на 70–80% и появлению характерных моторных нарушений — тремора покоя, гипокинезии, ригидности, постуральной неустойчивости и других симптомов [1, 2]. Особенностью этого заболевания является длительное развитие (до 30 лет) доклинической стадии без проявления характерных моторных дисфункций. БП до сих пор остается неизлечимым заболеванием, так как пациент в подавляющем большинстве случаев обращается к врачу при проявлении моторных нарушений (в клинической стадии), когда основная часть нейронов в кЧС уже погибла, и достичь полного излечения уже невозможно. Прогресс в лечении БП связывается с разработкой ранней диагностики БП и развитием патогенетически значимых нейропротективных стратегий. Однако в настоящее время нет фармакологического препарата, который бы эффективно защищал клетки мозга от патологического процесса или способствовал их восстановлению при БП [2, 3]. Поэтому основной акцент в этом направлении делается на изучение механизмов патогенеза БП с целью поиска молекулярных мишеней для превентивного лечения этого заболевания.

Согласно современным представлениям, важнейшим звеном патогенеза БП является накопление в нейронах токсичных олигомеров белка α -синуклеина, возникающее из-за нарушения его конформации [4]. Известно, что деградацию aberrantных белков (в том числе и α -синуклеина) в клетке обеспечивают убиквитин-протеасомная (УПС) и аутофаголизосомная системы [5, 6]. На основе фармакологического угнетения активности УПС в кЧС были созданы модели БП у грызунов, отражающие доклиническую и клиническую стадии БП [7–10].

Одним из важных достижений последнего десятилетия стало формирование представлений о глимфатической системе, осуществляющей очистку паренхимы головного мозга от различных метаболитов (в том числе — амилоидогенных белков), и активное исследование роли менингеальных лимфатических сосудов и глубоких шейных лимфатических узлов в обеспечении элиминации метаболитов [11–13]. Предполагается, что нарушение работы этих механизмов может являться одним из важнейших факторов развития нейродегенеративных заболеваний, и в связи с этим данная область исследований привлекает большое внимание ученых. Однако стоит отметить, что глимфатическая концепция остается довольно противоречивой и вызывает разногласия в научном сообществе, поскольку остается много открытых вопросов в отношении механизмов поступления жидкости в ткань мозга, функционально-анатомической организации и других аспектов [12, 13]. В настоящее время знания о взаимоотношениях между образованием, накоплением и клиренсом амилоидогенных белков из головного мозга по-прежнему остаются недостаточными. Считается, что одним из важнейших участников уникального механизма “самоочистки” мозга является водный канал аквапорин-4 (aquaporin-4, (AQP-4)) [11]. AQP-4 является трансмембранным белком и локализуется преимущественно на отростках астроцитов, окружающих кровеносные сосуды, что обеспечивает контакт с параваскулярным пространством. AQP-4, в отличие от других подтипов аквапоринов, наиболее распространен в головном мозге и считается основным каналом, поддерживающим водный гомеостаз и быстрое движение жидкости в глимфатической системе в ответ на осмотические изменения и другие особые требования в ЦНС [14–17]. Помимо своей основной функции в обеспечении водного гомеостаза, AQP-4 вовлечен и в другие процессы, такие как поглощение внеклеточного K^+ , клиренс глутамата, миграция астроцитов [17]. За последние 7 лет накоплены данные, указывающие на возможную взаимосвязь между функционированием водного канала AQP-4 и развитием БП. Обнаружено, что у пациентов с БП в ткани

кЧЧС происходит накопление свободной воды, усиливающееся с развитием болезни, что может свидетельствовать о нарушении водного гомеостаза и функционирования AQP-4 [18]. При этом показана отрицательная корреляция между отложением α -синуклеина и экспрессией AQP-4 [19]. Выяснено, что блокирование менингеального лимфатического оттока путем лигирования глубоких шейных лимфатических узлов у мышей усугубляет патологические и моторные симптомы, вызванные аберрантным α -синуклеином [20], а введение фибрилл α -синуклеина в дорсальный стриатум и кЧЧС нокаутированным по AQP-4 мышам ускоряет патологическое отложение α -синуклеина и способствует гибели DA-ергических нейронов и раннему проявлению моторных нарушений [21]. В МФТП (метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин)-модели БП у мышей нокаутирование по AQP-4 приводило также к значительному усилению гибели DA-ергических нейронов в кЧЧС, сопряженному с усилением нейровоспаления [22–24]. Эти данные свидетельствуют о том, что снижение экспрессии белка AQP-4 может усугубить Паркинсон-подобную патологию. Вероятно, это происходит за счет сбоя в работе лимфатической системы. Учитывая то, что в астроцитах кроме AQP-4 экспрессируются другие подтипы аквапоринов, пока остается неясным, могут ли эти подтипы компенсировать недостаток AQP-4 и повлиять на патогенез БП.

Следует отметить, что исследования, посвященные изучению роли AQP-4 в патогенезе БП, остаются малочисленными и проводились всего лишь на двух моделях БП у животных – α -синуклеиновой патологии и окислительного стресса, индуцированного нейротоксином МРТР. При этом использовались нокаутированные по AQP-4 животные, у которых может ожидать компенсаторное вовлечение других подтипов аквапоринов. Для лучшего понимания взаимосвязи между функционированием водного канала AQP-4 и развитием нейродегенерации при БП необходимо использовать как другие патогенетически значимые модели БП, так и иные методические подходы для ингибирования активности AQP-4, например – фармакологический. Модель БП, основанная на дисфункции УПС, отражает основные патофизиологические признаки БП и является пригодной для решения поставленных задач [10]. Таких исследований ранее не проводилось.

Задача настоящего исследования состояла в том, чтобы выяснить, какое влияние оказывает фармакологическое ингибирование водного канала AQP-4 в головном мозге на темп развития нейродегенерации и компенсаторные процессы в нигростриатной системе в модели БП, созданной на основе ингибирования протеасом в кЧЧС у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Эксперименты были выполнены на 30 взрослых самцах крыс популяции Вистар в возрасте 6–7 мес. и массой тела 350–400 г, выращенных в виварии Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. На протяжении всего исследования крыс содержали в одиночных клетках с неограниченным доступом к пище и воде при естественном освещении и температуре воздуха 21–23°C. Манипуляции с животными проводились в соответствии принципам Базельской декларации, этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ и протоколу, утвержденным этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Проведение операции по вживлению проводящих канюль

Перед проведением операции животных наркотизировали с помощью золетила (Zoletil®; Virbac, Франция), в дозе 60 мг/кг (внутримышечно). Установку канюль

проводили с использованием стереотаксического устройства (Narishige, Япония) согласно атласу координат для крыс линии Вистар [25]: для кчЧС – 5 мм каудальнее брегмы и 2 мм слева и справа от саггитального шва, для левого бокового желудочка – 0.5 мм каудальнее брегмы, 1.5 мм латерально. Глубина погружения канюли на уровне кчЧС в головной мозг крысы составляла 5.5–6 мм, на уровне левого бокового желудочка – 4 мм. Такие длины нижних частей канюль исключали возможность механического повреждения интересующих нас структур мозга. Для закрепления канюль использовался зубной цемент “Акродент” (“Стома”, Украина). После застывания цемента в канюли помещали мандрены. Эксперименты начинали не раньше, чем через 7 дней после проведения операции.

Препараты и экспериментальные группы

Для выполнения микроинъекций наркотизированное золетилом (внутримышечно, 45 мг/кг) животное помещали в стереотаксическое устройство (Narishige, Япония). Микроинъекции препаратов осуществляли с помощью шприцов Hamilton с инъекционными иглами нужной длины и диаметра. Используемые в исследовании препараты растворяли в стерильном фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline (PBS), пропущенном через фильтр-насадку на шприц PVDF 0.22 мкм (JET BIOFIL®, Корея).

Для исследования нами была выбрана хроническая модель БП у крыс, разработанная в лаборатории сравнительной термофизиологии, и созданная путем угнетения активности УПС в нигростриатной системе [8, 10, 26]. Данная модель позволяет моделировать основные патофизиологические признаки доклинической и клинической стадий БП у крыс. Для угнетения активности протеасом использовали специфический ингибитор их ферментативной активности лактацистин (ЛЦ) (Enzo Life Sciences, Великобритания). Введение ЛЦ осуществляли двукратно и билатерально в кчЧС в дозах 0.4 мкг/мкл (первая микроинъекция ЛЦ) и 4.0 мкг/мкл (вторая микроинъекция ЛЦ). Интервал между введениями составлял 7 дней.

Для подавления функционирования белка AQP-4 был выбран фармакологический подход и применен ингибитор 2-(никотинамид)-1,3,4-тиадиазол (2-(nicotinamide)-1,3,4-thiadiazole, TGN-020). Введение TGN-020 выполняли в боковой желудочек мозга в дозе 40 мкг и в объеме 6 мкл за 15 мин до введения ЛЦ. Поскольку коммерчески доступный препарат TGN-020 имеет низкую растворимость и для приготовления рабочего раствора требуется диметилсульфоксид, применение которого нежелательно для микроинъекций в мозг, в нашем исследовании была использована водорастворимая форма TGN-020 в виде натриевой соли, синтезированная В.А. Полукеевым (АО “Вектон”, Санкт-Петербург) согласно методическим протоколам разработчиков [27]. Контрольные группы животных получали микроинъекции растворителя препаратов (PBS) в том же объеме, что и экспериментальные животные. Скорость введения препаратов в канюлю составляла 0.5 мкл/мин (для TGN-020) и 0.1 мкл/мин (для ЛЦ). В конце эксперимента проводился гистологический контроль места инъекции (рис. 1).

Для выполнения исследования путем простой рандомизации были сформированы следующие группы животных:

Группа 1. Интактные животные ($n = 6$);

Группа 2. Контроль ($n = 6$; введение PBS (контрольного раствора) в левый боковой желудочек и в кчЧС);

Группа 3. TGN-020 ($n = 6$; введение TGN-020 в левый боковой желудочек и PBS в кчЧС);

Группа 4. ЛЦ ($n = 6$; введение PBS в левый боковой желудочек и ЛЦ в кчЧС);

Группа 5. ЛЦ + TGN-020 ($n = 6$; введение TGN-020 в левый боковой желудочек и ЛЦ в кчЧС).

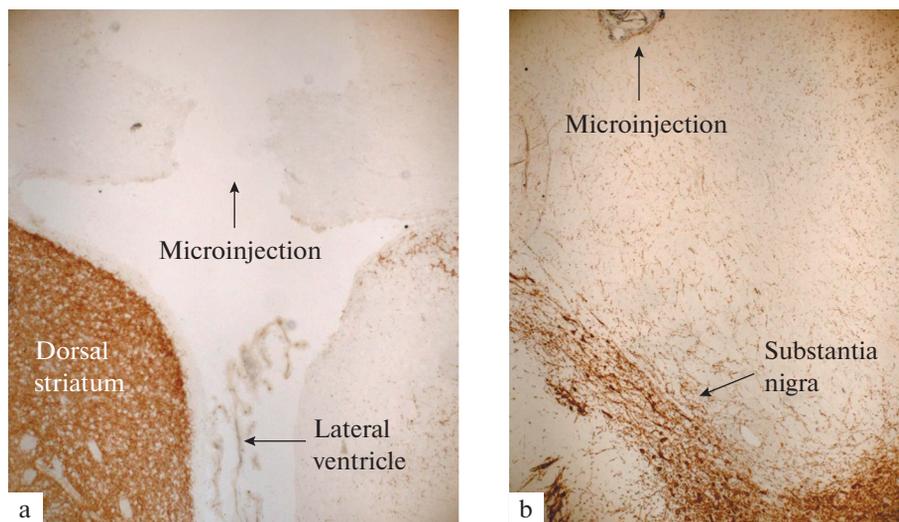


Рис. 1. Гистологический контроль мест микроинъекций. Световая микроскопия: (а) левый боковой желудочек, (б) черная субстанция. Срезы мозга окрашены антителами против тирозингидроксилазы. Стрелками обозначены места микроинъекций. Масштаб – 20 мкм.

Оценка изменений моторного поведения

Тесты на моторное поведение проводились через 19–20 дней после первого введения препаратов.

Тест с семенами подсолнечника (Sunflower seed test). Тест с семенами подсолнечника применяли для оценки изменений мелкой моторики передних конечностей, рта и языка [28]. В период содержания крыс в виварии в их рацион периодически добавляли небольшое количество семян подсолнечника. За сутки до тестирования крыс не кормили. В день эксперимента каждая крыса получала 10 семян подсолнечника, тестирование проводили с применением видеорегистрации. В ходе эксперимента определяли среднее время, затрачиваемое крысой на манипуляции, необходимые для поедания одного семени (взятие семечка передними конечностями, вскрытие кожуры, извлечение и поедание).

Тест “Открытое поле” (Open field test). Тест “Открытое поле” дает возможность выявить признаки гипокинезии и акинезии по изменению двигательной активности [29, 30]. Не менее чем за 1 ч до проведения теста животных переносили в экспериментальную комнату для адаптации. При проведении эксперимента соблюдали тишину. Крысу помещали в центр открытого поля (ООО “НПК Открытая Наука”, Россия), запускали программу видеотрекинга EthoVision (Noldus, США) и наблюдали за ее поведением в течение 5 мин. После тестирования каждого животного поверхности протирали влажной губкой и дезодорировали 3%-ным раствором перекиси водорода. Для того чтобы оценить изменения двигательной активности, выполняли автоматизированное вычисление общей длины пути, пройденного каждой крысой.

Тест “Сужающаяся дорожка” (Beam-walking test). Установку “Сужающаяся дорожка” (ООО “НПК Открытая Наука”, Россия) использовали для оценки моторной функции передних и задних конечностей, что позволяет выявить признаки развития сенсомоторного дефицита [31]. В данном тесте животное должно пройти по доске, которая постепенно сужается, и зайти в темный отсек. Доска состоит из 2 частей: верхней, по которой идет крыса, и более широкой нижней, позволяющей

фиксировать соскальзывания лапок и ошибочные постановки конечностей. В течение 4–5 дней до финального тестирования проводили предварительную адаптацию животных к помещению и экспериментальной установке. В день эксперимента не менее чем за 1 ч до проведения теста животных переносили в экспериментальную комнату для адаптации. В тесте “Сужающаяся дорожка” регистрировали постановку лапы на верхнюю или нижнюю доску. Подсчитывали количество постановок конечности на нижнюю доску (ошибок), количество соскальзываний конечности с верхней доски на нижнюю и общее количество шагов животного от стартовой линии до попадания в темный отсек. Полученные по трем попыткам данные усредняли.

Степень выраженности моторного дефицита отдельно для передних и задних конечностей рассчитывали по формуле, рекомендованной производителем экспериментальной установки:

$$\begin{aligned} \text{Моторный дефицит, \%} &= \\ &= \frac{\text{ошибка} + 0.5 \times \text{соскальзывания} \times 100}{100}. \end{aligned}$$

Иммуногистохимическое исследование

Крыс декапитировали через 21 день после первого введения препаратов. Животных наркотизировали с помощью хлоралгидрата (внутрибрюшинно, 400 мг/кг). Для дальнейшего иммуногистохимического исследования мозг быстро извлекали из черепной коробки и фиксировали в 10%-ном растворе формалина (Биовитрум, Россия) при температуре 4°C. Через 4–5 дней после декапитации мозг промывали в PBS (pH 7.4) и помещали в 20%-ный раствор сахарозы для криопротекции при температуре 4°C. Через 5–7 дней мозг замораживали в изопентане, охлажденном с помощью сухого льда до –45°C, и далее хранили в морозильной камере при температуре –80°C. Изготовление чередующихся серий фронтальных срезов головного мозга крыс толщиной 10 мкм осуществлялось на криостате Leica (Германия). Локализацию структур (кчЧС и дорсального стриатума) определяли с помощью анатомического атласа мозга крысы [25]. Предметные стекла со срезами высушивали в течение суток при комнатной температуре и далее хранили при температуре –20°C.

Для визуализации и последующего подсчета количества выживших DA-ергических нейронов в кчЧС и их аксонов в стриатуме, а также оценки содержания в нейронах кчЧС скорость-лимитирующего фермента синтеза DA тирозингидроксилазы (ТГ), использовали биотин-стрептавидиновый метод. После выполнения стандартных подготовительных этапов [10] срезы кчЧС и стриатума инкубировали с первичными поликлональными антителами кролика против ТГ (Abscam, Великобритания (1 : 700)) и оставляли на сутки при комнатной температуре во влажной камере. Затем срезы инкубировали со вторичными антителами козы против кролика, конъюгированными с биотином (Vector Laboratories, США (1 : 400)), в течение 1 ч при комнатной температуре, и далее – со стрептавидин-пероксидазой (Vector Laboratories, США (1 : 400)) в течение 1 ч при комнатной температуре. Визуализация осуществлялась с использованием 3,3'-диаминобензидина. После стандартной проводки в спиртах восходящей концентрации препараты помещали в среду Microclearing (Diapath, Италия) и затем заключали под покровное стекло с помощью среды Витрогель (Биовитрум, Россия). Далее стекла хранили при комнатной температуре.

Окрашивание нейронов по методу Ниссля

Известно, что на результат иммуногистохимического исследования может влиять ряд различных факторов, в частности — количество белка-мишени, качество взаимодействия антигена и антитела. Для того чтобы получить дополнительное свидетельство развития нейродегенеративного процесса в кЧЧС, использовали стандартную методику окраски нейронов по методу Ниссля с использованием 1%-ного раствора толуидинового синего. Дифференцирование в 96%-ном этиловом спирте проводили под визуальным контролем с использованием светового микроскопа (Биомед, Россия) до проявления у окрашенных клеток ядра, ядрышка и светлой зернистой цитоплазмы. Затем стекла высушивали, помещали в среду Microclearing (Diapath, Италия) и заключали под покровное стекло с помощью среды Витрогель (Биовитрум, Россия). Окрашенные стекла со срезами хранили в затемненном месте при комнатной температуре.

Морфологический анализ препаратов

Изображения исследуемых структур мозга получали с помощью микроскопа Karl Zeiss (Imager A1) со встроенной видеокамерой и программы Zen Blue для захвата изображения в формате [jpg]. Подсчет ТГ-иммунопозитивных нейронов кЧЧС с видимым ядром и нейронов кЧЧС, окрашенных по методу Ниссля и имеющих отчетливо видимое ядро и ядрышко, проводили с применением программы PhotoM (http://www.t_lambda.chat.ru/). Для каждого животного было обработано 8–10 снимков кЧЧС. Оптическая плотность ТГ, используемая для анализа содержания этого фермента в нейронах кЧЧС, рассчитывалась компьютерной программой PhotoM как средний десятичный логарифм отношения яркости фона, не содержащего иммунореактивное вещество, к яркости точки объекта (нейронов кЧЧС, содержащих иммунореактивное вещество ТГ) при прохождении волны света длиной 650 нм на том же срезе. Данные по изменению оптической плотности ТГ выражали в условных единицах (у. е). Для подсчета количества ТГ-иммунореактивных аксонов в дорсальном стриатуме использовали программу ImageJ/Fiji (НИН, США), позволяющей полуавтоматически (под контролем экспериментатора) выделять интенсивно окрашенные аксоны и анализировать их количество на каждом снимке. У каждого животного было обработано 15–20 снимков.

Статистическая обработка результатов

Анализ всех полученных результатов проводился в программе GraphPad Prism 8. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения средних значений двух независимых выборок использовали *t*-критерий Стьюдента. Статистическую обработку результатов, распределенных нормально, осуществляли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA, с последующим Tukey post-hoc анализом. Различия результатов между группами считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$, результаты представлены в виде $mean \pm SEM$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроинъекции контрольного раствора и TGN-020 не оказывают влияния на моторное поведение, показатели нейродегенерации в нигростриатной системе и содержание тирозингидроксилазы в DA-ергических нейронах компактной части черной субстанции

Для того чтобы выяснить, оказывает ли операция по вживлению направляющих канюль и последующее введение PBS влияние на моторное поведение и развитие

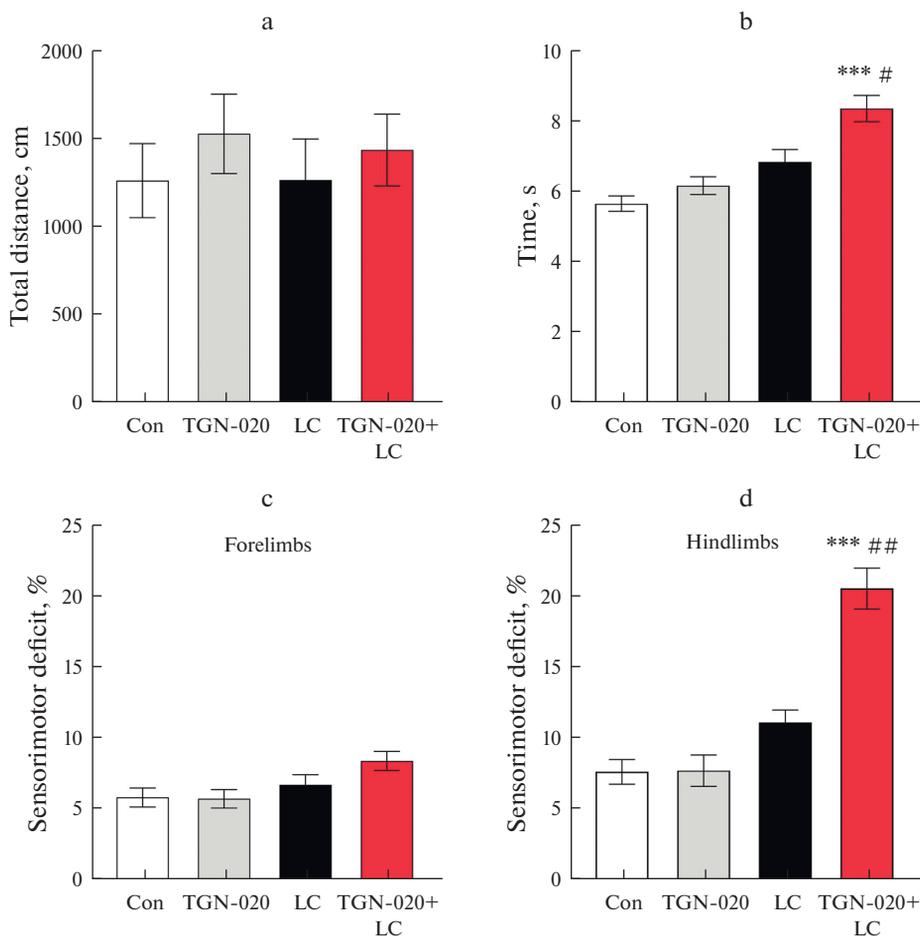


Рис. 2. Влияние TGN-020 на показатели моторного поведения в лактастиновой модели БП у крыс.

a) общая пройденная дистанция в тесте “Открытое поле”(см);

b) средняя продолжительность поедания семечка подсолнечника (с) (Interaction $F(1, 20) = 2.71, p = 0.11$; “TGN-020” factor $F(1, 20) = 10.89, p = 0.0036$; “LC” factor $F(1, 20) = 29.86, p < 0.001$);

c) сенсомоторный дефицит верхних конечностей (%);

d) сенсомоторный дефицит нижних конечностей (%) (Interaction $F(1, 20) = 10.55, p = 0.0040$; “TGN-020” factor $F(1, 20) = 9.35, p = 0.0062$; “LC” $F(1, 20) = 31.51, p < 0.001$).

*** $p < 0.001$ – достоверность различий по сравнению с контролем; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверность различий между ЛЦ и TGN-020 + ЛЦ.

нейродегенеративного процесса в nigростриатной системе у крыс, был проведен сравнительный анализ этих показателей у двух групп животных – интактных и подвергшихся хирургическому вмешательству и микроинъекциям. Установлено, что проведение операции и выполнение микроинъекций PBS в ликвор бокового желудочка мозга и кЧЧС не приводило к появлению моторных нарушений у крыс. У контрольных животных, по сравнению с интактными, не было обнаружено статистически значимого изменения количества иммунореактивных к ТГ нейронов в кЧЧС (99.1 ± 1.9 vs $103.0 \pm 2.6, p = 0.64$) и их аксонов в дорсальном стриатуме ($4.9 \pm 0.2 \times 10^3$ vs $5.0 \pm 0.1 \times 10^3, p = 0.69$), а также общего числа нейронов в кЧЧС, окра-

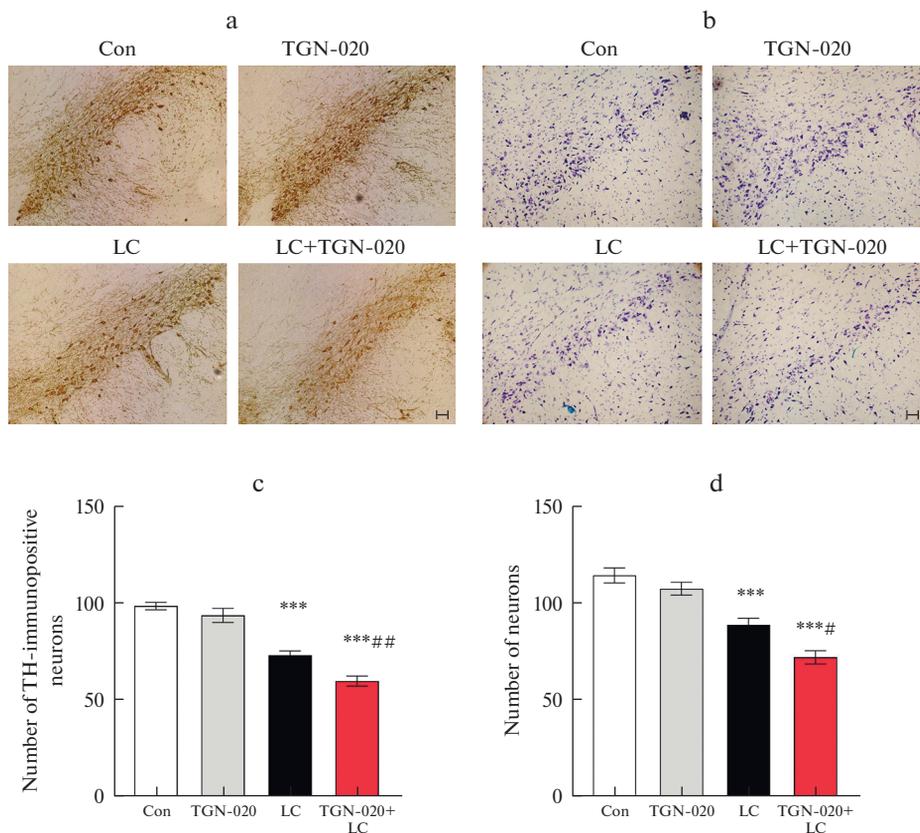


Рис. 3. Влияние TGN-020 на число нейронов в кЧС в лактацетиновой модели БП у крыс. Световая микроскопия: а) ТГ-иммунопозитивные нейроны кЧС (масштаб 50 мкм); б) нейроны кЧС, окрашенные по методу Ниссля (масштаб 50 мкм). в) число ТГ-иммунопозитивных нейронов в кЧС (interaction $F(1, 20) = 2.57, p = 0.12$; “TGN-020” factor $F(1, 20) = 11.71, p = 0.0027$; “LC” factor $F(1, 20) = 124.2, p < 0.001$); д) число нейронов кЧС, окрашенных по методу Ниссля (interaction $F(1, 20) = 2.02, p = 0.17$; “TGN-020” factor $F(1, 20) = 11.34, p = 0.0031$; “LC” factor $F(1, 20) = 75.54, p < 0.001$). *** $p < 0.001$ – достоверность различий по сравнению с контролем; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ – достоверность различий между ЛЦ и TGN-020 + ЛЦ.

шенных по методу Ниссля (114.3 ± 3.9 vs $123.4 \pm 3.3, p = 0.10$). Анализ оптической плотности ТГ в телах ДА-ергических нейронов в кЧС не выявил изменений содержания этого фермента у контрольных животных по сравнению с интактными (0.21 ± 0.01 vs $0.22 \pm 0.01, p = 0.85$). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что проведение хирургической операции и введение контрольных растворов не оказывает значительного влияния на исследуемые показатели.

Далее нами было изучено влияние микроинъекций TGN-020 на вышеперечисленные показатели по сравнению с контролем (PBS). Выяснено, что применяемая доза TGN-020 не вызывает изменений показателей моторного поведения (рис. 2), не приводит к развитию нейродегенерации в nigrostriatalной системе и изменению содержания ТГ в ДА-ергических нейронах кЧС (рис. 3–5).

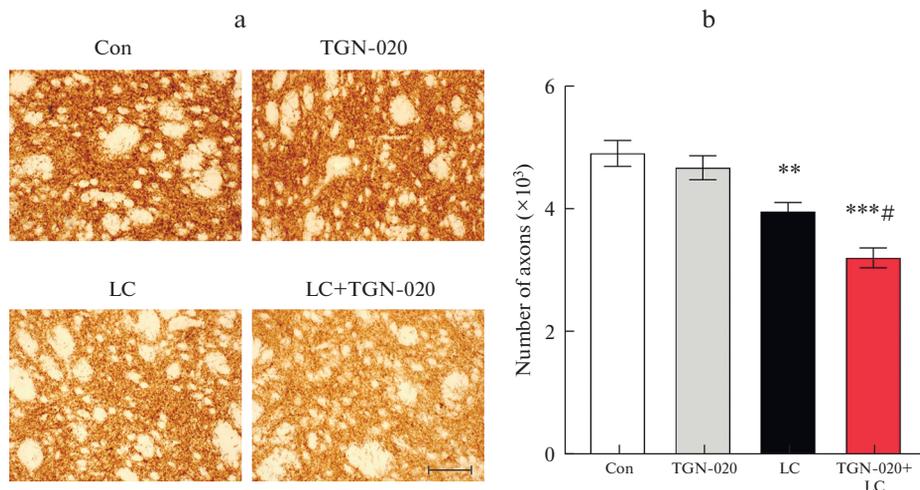


Рис. 4. Влияние TGN-020 на количество DA-ергических аксонов в дорсальном стриатуме в лактацистинной модели БП у крыс.

a) световая микроскопия: микрофотографии аксонов в дорсальном стриатуме (масштаб 50 мкм);

b) число аксонов в дорсальном стриатуме (interaction $F(1, 20) = 2.05, p = 0.17$; "TGN-020" factor $F(1, 20) = 7.41, p = 0.01$; "LC" factor $F(1, 20) = 44.75, p < 0.001$).

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – достоверность различий по сравнению с контролем;

$p < 0.05$ – достоверность различий между ЛЦ и TGN-020 + ЛЦ.

Ингибитор TGN-020 вызывает развитие моторных нарушений, усиление нейродегенерации в нигростриатной системе и снижение содержания тирозингидроксилазы в DA-ергических нейронах компактной части черной субстанции в модели БП у крыс

Проведенное нами исследование показало, что введение ЛЦ не вызывает развития моторных нарушений (рис. 2). Проведение морфологического анализа позволило выяснить, что применение ЛЦ приводит к уменьшению числа иммунореактивных к ТГ нейронов в кЧЧС на 27% ($p < 0.001$) (рис. 3a, c) и их аксонов в стриатуме на 19% ($p < 0.01$) (рис. 4). При подсчете числа нейронов в кЧЧС на препаратах, окрашенных по методу Ниссля, было выявлено уменьшение их количества на 24% ($p < 0.001$) (рис. 3b, d). Этот результат согласуется с данными, полученными при подсчете ТГ-иммунопозитивных клеток в кЧЧС. При изучении уровня ТГ в DA-ергических нейронах кЧЧС значимых изменений обнаружено не было (рис. 5). Таким образом, микроинъекции ЛЦ приводили к развитию нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе, степень выраженности которого соответствовала допороговому уровню по сравнению с уровнем нейродегенерации при клинической стадии БП, при которой погибает более половины нейронов кЧЧС. Наблюдаемые нами нейродегенеративные изменения в нигростриатной системе, не сопровождающиеся развитием моторных нарушений, соответствуют характеристикам доклинической стадии БП.

Нами впервые было апробировано введение TGN-020 в ликворную систему головного мозга с целью выявления взаимосвязи между снижением активности AQP-4 и развитием патологических признаков БП у модельных животных. При изучении моторного поведения не было выявлено достоверного изменения общей пройденной дистанции в тесте "Открытое поле" у животных, получавших TGN-20

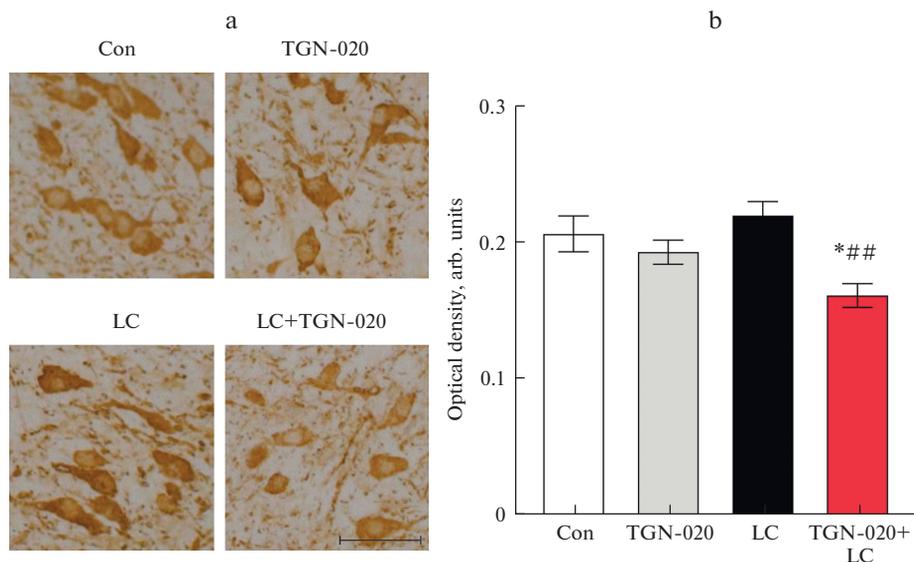


Рис. 5. Влияние TGN-020 на содержание тирозингидроксилазы в нейронах кЧС в лактацистиновой модели БП у крыс.

a) световая микроскопия: микрофотографии ТГ-иммунопозитивных нейронов кЧС (масштаб 50 мкм); b) изменение оптической плотности ТГ в нейронах кЧС (interaction $F(1, 20) = 7.59, p = 0.01$; “TGN-020” factor $F(1, 20) = 9.54, p = 0.0058$; “LC” factor $F(1, 20) = 2.02, p = 0.17$).

* $p < 0.05$ – достоверность различий по сравнению с контролем; ## $p < 0.01$ – достоверность различий между ЛЦ и TGN-020 + ЛЦ.

перед микроинъекциями ЛЦ, по сравнению с группой животных, воспроизводивших модель доклинической стадии БП (рис. 2a). Однако и по сравнению с контролем, и по сравнению с доклинической моделью БП в тесте с семенами подсолнечника было отмечено увеличение среднего времени, затрачиваемого крысой на вскрытие и поедание семечка (рис. 2b), а в тесте “Сужающаяся дорожка” – появление признаков сенсомоторного дефицита нижних конечностей (рис. 2c, d).

Подсчет количества DA-ергических нейронов в кЧС и их аксонов в дорсальном стриатуме при введении TGN-020 в модели доклинической стадии БП позволил установить, что ингибитор AQP-4 приводит к увеличению числа погибших DA-ергических нейронов кЧС в 1.7 раз ($p < 0.01$) (рис. 3a, c), а их аксонов в дорсальном стриатуме – в 1.6 раз ($p < 0.05$) (рис. 4) по сравнению с действием одного ЛЦ. Сходные данные были получены при подсчете нейронов кЧС на препаратах, окрашенных по методу Ниссля: применение TGN-020 в доклинической модели БП у крыс приводило к увеличению числа погибших нейронов в кЧС в 1.56 раз ($p < 0.05$) по сравнению с действием ЛЦ (рис. 3b, d). Для того чтобы оценить влияние TGN-020 на уровень ТГ в DA-ергических нейронах кЧС в модели доклинической стадии БП, было проанализировано изменение оптической плотности ТГ. Установлено, что оптическая плотность ТГ в нейронах кЧС в группе животных, получавших TGN-020 до ЛЦ, снижалась на 17% ($p < 0.05$) по сравнению с контролем и на 21% ($p < 0.01$) по сравнению с группой крыс с доклинической стадией БП (рис. 5)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного исследования было установлено, что введение ЛЦ в кЧС приводит к гибели 27% ДА-ергических нейронов в кЧС и 19% их аксонов в дорсальном стриатуме. В этих условиях не было выявлено снижения уровня ТГ в выживших нейронах кЧС и не наблюдалось признаков моторных нарушений (нарушений мелкой моторики передних конечностей, рта и языка, изменения общей пройденной дистанции, признаков сенсомоторного дефицита). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что примененный протокол введения ЛЦ позволяет моделировать доклиническую стадию БП. Отсутствие двигательных нарушений в этой модели можно объяснить сохранением компенсаторных процессов в нигростриатной системе, направленных на поддержание уровня дофамина на уровне нормы. Кроме того, не исключено, что маскированию моторной симптоматики при развитии нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе может способствовать увеличение уровня везикулярного транспортера моноаминов 2 [10], уменьшение экспрессии мембранного переносчика дофамина, уменьшение активности монооксидазы В, обеспечивающей деградацию дофамина [32].

Для того чтобы оценить влияние ослабления функции AQP-4 на развитие нейродегенеративного процесса в нигростриатной системе, нами был применен фармакологический ингибитор AQP-4 TGN-020 в модели доклинической стадии БП у крыс [27, 33]. Согласно данным литературы, этот препарат является одним из наиболее часто используемых для ингибирования AQP-4 в различных моделях неврологических нарушений [34–36]. Применение магнитно-резонансной томографии показало, что введение TGN-020 замедляло распространение контрастного вещества в тканях головного мозга и подавляло клиренс тау-белка [11, 37]. Эти данные свидетельствуют о том, что применение TGN-020 может нарушать работу глимфатической системы. Однако следует отметить, что все вышеперечисленные исследования были выполнены с использованием внутрибрюшинного пути введения TGN-020. В исследовании на мышах было обнаружено, что меченый препарат [¹¹C]TGN-020 после системного введения может обнаруживаться в сердце [27]. Кроме того, авторы высказали предположение, что TGN-020 также может оказывать ингибирующее действие на другой водный канал, AQP-1, который на 60% гомологичен AQP-4. Для того чтобы избежать влияния TGN-020 на работу AQP-4 и, возможно, AQP-1 в периферических органах, нами было принято решение использовать центральные микроинъекции этого препарата в ликворную систему головного мозга. Проведенное нами исследование показало, что применение TGN-20 в модели доклинической стадии БП не привело к развитию признаков гипокинезии, однако были обнаружены симптомы нарушения тонкой моторики (судя по увеличению времени, затрачиваемого крысой на вскрытие и поедание семечек подсолнечника) и признаки развития сенсомоторного дефицита задних конечностей. Появление моторных нарушений было сопряжено с увеличением числа погибших ДА-ергических нейронов в кЧС в 1.7 раза и их аксонов в дорсальном стриатуме в 1.6 раза по сравнению действием одного ЛЦ, что свидетельствовало об ускорении процесса нейродегенерации в нигростриатной системе. Подобный уровень нейродегенерации сам по себе может быть недостаточно высоким, чтобы вызвать отчетливые моторные нарушения, однако нами было обнаружено снижение уровня ТГ в нейронах кЧС на 21%, которое свидетельствует об ослаблении компенсаторных механизмов поддержания уровня дофамина в нигростриатной системе, что способствует проявлению симптомов паркинсонизма.

Результаты выполненного нами исследования, свидетельствующие об ускорении нейродегенеративного процесса в условиях действия ингибитора AQP-4, согласуются с данными, полученными другими исследователями в экспериментах на

нокаутированных по AQP-4 мышах [21–23]. Установлено, что через 6 месяцев после введения фибрилл α -синуклеина в дорсальный стриатум число DA-ергических нейронов в кЧС у мышей AQP4^{+/-} и мышей дикого типа уменьшалось на 55.2% и 31.8%, что свидетельствовало об усилении нейродегенерации в кЧС при подавлении экспрессии AQP-4. Кроме того, у мышей AQP4^{+/-} по сравнению с мышами дикого типа было отмечено более раннее развитие моторной дисфункции (ухудшение координации, уменьшение мышечной силы и снижение двигательной активности [21]. При использовании нокаутированных по AQP-4 мышей в острой и хронической МФТП-моделях БП также было обнаружено достоверное увеличение числа погибших DA-ергических нейронов в кЧС по сравнению с мышами дикого типа [23, 24]. Кроме того, было выявлено, что в острой и хронической МФТП-модели БП у AQP4^{+/-} мышей отмечается более выраженная потеря ТГ-иммунопозитивных волокон не только в дорсальном, но и в вентральном стриатуме, и увеличение числа погибших DA-ергических нейронов в вентральной тегментальной области [23]. Эти данные свидетельствуют о том, что снижение экспрессии AQP-4 приводит к увеличению уязвимости к МФТП и цитотоксичности олигомеров α -синуклеина.

Используемая нами ЛЦ-модель БП характеризуется развитием α -синуклеиновой патологии в кЧС [9, 10, 38]. Это позволило нам предположить, что одним из ключевых механизмов, лежащих в основе TGN-020 – индуцированной прогрессии нейродегенерации в нигростриатной системе, может являться накопление токсичных олигомеров α -синуклеина во внеклеточной среде из-за снижения активности водного канала AQP-4, которое может приводить к нарушению водного обмена между цереброспинальной и интерстициальной жидкостями в головном мозге. Известно, что олигомерный α -синуклеин, обладающий прионными свойствами, может посредством различных механизмов выходить во внеклеточное пространство и затем интернализироваться соседними клетками (нейронами, астроцитами, микроглией) [39, 40]. Недостаточно эффективная “очистка” клеток мозга и межклеточного пространства от нейротоксичных форм этого белка может приводить к прогрессированию патологии БП. Было продемонстрировано, что введение патогенных фибрилл α -синуклеина в дорсальный стриатум частично нокаутированным по AQP-4 мышам (AQP4^{+/-}) по сравнению с мышами дикого типа вызывает усиленное накопление патологического α -синуклеина в стриатуме, черной субстанции и моторной коре [21]. При этом отмечалось увеличение содержания нерастворимой формы α -синуклеина в различных областях коры и стриатуме. Введение в дорсальный стриатум рекомбинантного α -синуклеина с флуоресцентной меткой показало, что у мышей со сниженной экспрессией AQP-4 область флуоресценции была значительно больше, чем у мышей дикого типа, что могло свидетельствовать о нарушении лимфатического клиренса [21]. В другом исследовании было показано, что у мышей AQP4^{+/-} по сравнению с мышами дикого типа также было отмечено замедление клиренса растворимых форм рекомбинантного человеческого α -синуклеина (A53T и α -syn A30P) из паренхимы мозга. Однако авторы исследования не обнаружили увеличения агрегации олигомеров α -синуклеина и предполагают, что AQP-4 участвует в клиренсе растворимых макромолекул из паренхимы головного мозга [20]. Применение фармакологического ингибирования AQP-4 с помощью TGN-020 в моделях болезни Альцгеймера на животных также способствовало развитию амилоидогенеза и прогрессии нейродегенерации [36, 37]. Совокупность представленных выше наших экспериментальных данных и данных литературы указывает на связь AQP-4 с развитием БП. Можно предположить, что дисфункция AQP-4 может приводить к нарушению функционирования лимфатической системы вследствие снижения эффективности водного обмена между

интерстициальной и спинномозговой жидкостью в головном мозге, что, в свою очередь, вызывает усугубление α -синуклеиновой патологии и усиление нейродегенеративного процесса.

Известно, что α -синуклеин может удаляться из внеклеточного пространства путем эндоцитоза или фагоцитоза астроцитами и микроглиоцитами [41]. Нарушение функционирования AQP-4 в результате фармакологического ингибирования могло негативно сказаться на способности астроцитов захватывать и разрушать патологические формы α -синуклеина. Кроме того, AQP-4 может быть вовлечен в механизмы развития нейровоспаления, являющегося одним из важнейших звеньев патогенеза БП [3, 23, 42]. Можно предположить, что подавление функционирования AQP-4 может способствовать усилению нейровоспаления и ускорению нейродегенеративного процесса, наблюдаемому в нашем исследовании. Перечисленные выше механизмы являются основными предполагаемыми факторами, лежащими в основе TGN-020-индуцированного усиления нейродегенеративного процесса, наблюдаемого в нашем исследовании. Однако, несмотря на то, что молекулярные механизмы очистки головного мозга от метаболитов чрезвычайно активно исследуются, в отношении концепции глимфатико-лимфатической системы по-прежнему остается много противоречий и вопросов, на которые еще только предстоит ответить.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что AQP-4 играет важную роль в молекулярных механизмах защиты нейронов от нейротоксических факторов при развитии Паркинсон-подобной патологии. В связи с тем, что AQP-4 является ключевым звеном в обеспечении водного гомеостаза головного мозга, этот канал представляется перспективной терапевтической мишенью. Новые данные, полученные в ходе поиска путей модуляции функционирования и локализации AQP-4, могут иметь большое значение для разработки новых подходов превентивной терапии БП и других нейродегенеративных патологий мозга.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00607).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К.В.Л., И.В.Е.), проведение экспериментов (К.В.Л., Ю.Ю.А., М.А.Г.), обработка данных (К.В.Л., Ю.Ю.А., М.А.Г.), написание и редактирование манускрипта (К.В.Л., И.В.Е.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.А. Полукееву (АО “Вектон”, Санкт-Петербург) за синтез водорастворимой формы TGN-020 и В.Н. Шипилову (ИЭФБ РАН) за последующую лиофилизацию препарата на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием ИЭФБ РАН.

Подготовка гистологических препаратов и световая микроскопия с фотосъемкой проводились на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием ИЭФБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F* (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20(4): 415–455.
[https://doi.org/10.1016/0022-510x\(73\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0022-510x(73)90175-5)
2. *Váradi C* (2020) Clinical features of Parkinson's disease: the evolution of critical symptoms. *Biology (Basel)* 9(5): 103.
<https://doi.org/10.3390/biology9050103>
3. *Devos D, Hirsch E, Wyse R* (2021) Seven solutions for neuroprotection in Parkinson's disease. *Mov Disord* 36(2): 306–316.
<https://doi.org/10.1002/mds.28379>
4. *Henderson MX, Trojanowski JQ, Lee VM-Y* (2019) α -Synuclein pathology in Parkinson's disease and related α -synucleinopathies. *Neurosci Lett* 709: 134316.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019>
5. *Ebrahimi-Fakhari D, Wahlster L, McLean PJ* (2012) Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. *Acta Neuropathol* 124(2): 153–172.
<https://doi.org/10.1007/s00401-012-1004-6>
6. *Frankowska N, Lisowska K, Witkowski JM* (2022) Proteolysis dysfunction in the process of aging and age-related diseases. *Front Aging* 3: 927630.
<https://doi.org/10.3389/fragi.2022.927630>
7. *McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW* (2004) Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56(1): 149–162.
<https://doi.org/10.1002/ana.20186>
8. *Пастухов ЮФ, Екимова ИВ, Чеснокова АЮ* (2014) Молекулярные механизмы патогенеза болезни Паркинсона и перспективы превентивной терапии. В: Нейродегенеративные заболевания – от генома до целостного организма. МВ Угрюмов (ред) М. Научный мир. 316–355. [*Pastukhov YuF, Ekimova IV, Chesnokova AYU* (2014) Molecular mechanisms of the pathogenesis of Parkinson's disease and the prospects for preventive therapy. In: Neurodegenerative diseases: from genome to the whole organism. MB Ugryumov (ed) M. Nauchnyi Mir. 316–355. (In Russ)].
9. *Bentea E, Verbruggen L, Massie A* (2017) The proteasome inhibition model of Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 7(1): 31–63.
<https://doi.org/10.3233/JPD-160921>
10. *Ekimova IV, Plaksina DV, Pastukhov YF, Lapshina KV, Lazarev VF, Mikhaylova ER, Polonik SG, Pani B, Margulis BA, Guzhova IV, Nudler E* (2018) New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 306: 199–208.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.012>
11. *Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Ploggs BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M* (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 4(147): 147ra111.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
12. *Semyachkina-Glushkovskaya O, Postnov D, Kurths J* (2018) Blood brain barrier, lymphatic clearance, and recovery: Ariadne's thread in labyrinths of hypotheses. *Int J Mol Sci* 19(12): 3818.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123818>
13. *Natale G, Limanaqi F, Busceti CL, Mastroiacovo F, Nicoletti F, Puglisi-Allegra S, Fornai F* (2021) Glymphatic system as a gateway to connect neurodegeneration from periphery to CNS. *Front Neurosci* 15: 639140.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.639140>
14. *Kong H, Fan Y, Xie J, Ding J, Sha L, Xueru S* (2008) AQP4 knockout impairs proliferation, migration and neuronal differentiation of adult neural stem cells. *J Cell Sci* 121: 4029–4036.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.011>
15. *Hubbard JA, Szu JJ, Binder DK* (2018) The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res Bull* 136: 118–129.
16. *Mader S, Brimberg L* (2019) Aquaporin-4 water channel in the brain and its implication for health and disease. *Cells* 8(2): 90.
<https://doi.org/10.3390/cells8020090>
17. *Zhou Z, Zhan J, Cai Q, Xu F, Chai R, Lam K, Luan Z, Zhou G, Tsang S, Kipp M, Han W, Zhang R, Yu ACH* (2022) The water transport system in astrocytes-aquaporins. *Cells* 11(16): 2564.
<https://doi.org/10.3390/cells11162564>
18. *Ofori E, Pasternak O, Planetta PJ, Burciu R, Snyder A, Febo M, Golde TE, Okun MS, Vaillancourt DE* (2015) Increased free water in the substantia nigra of Parkinson's disease: a single-site and multi-site study. *Neurobiol Aging* 36(2): 1097–1104.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.029>

19. *Hoshi A, Tsunoda A, Tada M, Nishizawa M, Ugawa Y, Kakita A* (2017) Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 in the temporal neocortex of patients with Parkinson's Disease. *Brain Pathol* 27(2): 160–168.
<https://doi.org/10.1111/bpa.12369>
20. *Zou W, Pu T, Feng W, Lu M, Zheng Y, Du R, Xiao M, Hu G* (2019) Blocking meningeal lymphatic drainage aggravates Parkinson's disease-like pathology in mice overexpressing mutated α -synuclein. *Transl Neurodegener* 8: 7.
<https://doi.org/10.1186/s40035-019-0147-y>
21. *Cui H, Wang W, Zheng X, Xia D, Liu H, Qin C, Tian H, Teng J* (2021) Decreased AQP4 expression aggravates α -Synuclein pathology in Parkinson's disease mice, possibly via impaired glymphatic clearance. *J Mol Neurosci* 71: 1–14.
<https://doi.org/10.1007/s12031-021-01836-4>
22. *Zhang J, Yang B, Sun H, Zhou Y, Liu M, Ding J, Fang F, Fan Y, Hu G* (2016) Aquaporin-4 deficiency diminishes the differential degeneration of midbrain dopaminergic neurons in experimental Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 614: 7–15.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.057>
23. *Sun H, Liang R, Yang B, Zhou Y, Liu M, Fang F, Hu G* (2016) Aquaporin-4 mediates communication between astrocyte and microglia: Implications of neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Neuroscience* 317: 65–75.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.003>
24. *Xue X, Zhang W, Zhu J, Chen X, Zhou S, Xu Z, Hu G, Su C* (2019) Aquaporin-4 deficiency reduces TGF- β 1 in mouse midbrains and exacerbates pathology in experimental Parkinson's disease. *J Cell Mol Med* 23(4): 2568–2582.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.003>
25. *Paxinos G, Watson C* (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th Edition. San Diego. Acad Press.
26. *Plaksina DV, Ekimova IV* (2018) Study of age changes in compensatory processes on the model of neurodegeneration of nigrostriatal system in rats. *Adv Gerontol* 31(2): 170–177.
27. *Nakamura Y, Suzuki Y, Tsujita M, Huber VJ, Yamada K, Nakada T* (2011) Development of a novel ligand, [C]TGN-020, for aquaporin 4 positron emission tomography imaging. *ACS Chem Neurosci* 2(10): 568–571.
<https://doi.org/10.1021/cn2000525>
28. *Kane JR, Ciucci MR, Jacobs AN, Tews N, Russell JA, Ahrens AM, Ma ST, Britt JM, Cormack LK, Schallert T* (2011) Assessing the role of dopamine in limb and cranial-oculomotor control in a rat model of Parkinson's disease. *J Commun Disord* 44: 529–537.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcomdis.2011.04.005>
29. *Campos FL, Carvalho MM, Cristovão AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, Kim YS, Sousa N* (2013) Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci* 7: 175.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00175>
30. *Prasad EM, Hung SY* (2020) Behavioral tests in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Antioxidants (Basel)* 9(10): 1007.
<https://doi.org/10.3390/antiox9101007>
31. *Fleming SM, Ekhtor OR, Ghisays V* (2013) Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *J Vis Exp* (76): 50303.
<https://doi.org/10.3791/50303>
32. *Blesa J, Trigo-Damas I, Dileone M, Del Rey NL, Hernandez LF, Obeso JA* (2017) Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. *Exp Neurol* 298: 148–161.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.002>
33. *Huber VJ, Tsujita M, Nakada T* (2009) Identification of Aquaporin 4 inhibitors using in vitro and in silico methods. *Bioorgan Med Chem* 17: 411–417.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.12.040>
34. *Igarashi H, Huber VJ, Tsujita M, Nakada T* (2011) Pretreatment with a novel aquaporin 4 inhibitor, TGN-020, significantly reduces ischemic cerebral edema. *Neurol Sci* 32(1): 113–116.
<https://doi.org/10.1007/s10072-010-0431-1>
35. *Abir-Awan M, Kitchen P, Salman MM, Conner MT, Conner AC, Bill RM* (2019) Inhibitors of mammalian aquaporin water channels. *Int J Mol Sci* 20(7): 1589.
<https://doi.org/10.3390/ijms20071589>
36. *Harrison IF, Ismail O, Machhada A, Colgan N, Ohene Y, Nahavandi P, Ahmed Z, Fisher A, Mef-tah S, Murray TK, Ottersen OP, Nagelhus EA, O'Neill MJ, Wells JA, Lythgoe MF* (2020) Impaired glymphatic function and clearance of tau in an Alzheimer's disease model. *Brain* 143(8): 2576–2593.
<https://doi.org/10.1093/brain/awaa179>
37. *Rosu GC, Catalin B, Balseanu TA, Laurentiu M, Claudiu M, Kumar-Singh S, Daniel P* (2020) Inhibition of aquaporin 4 decreases amyloid A β 40 drainage around cerebral vessels. *Mol Neuro-*

- biol 57(11): 4720–4734.
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02044-8>
38. *Savolainen MH, Albert K, Airavaara M, Myöhänen TT* (2017) Nigral injection of a proteasomal inhibitor, lactacystin, induces widespread glial cell activation and shows various phenotypes of Parkinson's disease in young and adult mouse. *Exp Brain Res* 235(7): 2189–2202.
<https://doi.org/10.1007/s00221-017-4962-z>
39. *Uemura N, Uemura MT, Luk KC, Lee VM, Trojanowski JQ* (2020) Cell-to-cell transmission of tau and α -Synuclein. *Trends Mol Med* 26(10): 936–952.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.03.012>
40. *Choi YR, Park SJ, Park SM* (2021) Molecular events underlying the cell-to-cell transmission of α -synuclein. *FEBS J* 288(23): 6593–6602.
<https://doi.org/10.1111/febs.15674>
41. *Stefanis L, Emmanouilidou E, Pantazopoulou M, Kirik D, Vekrellis K, Tofaris GK* (2019) How is alpha-synuclein cleared from the cell? *J Neurochem* 150(5): 577–590.
<https://doi.org/10.1111/jnc.14704>
42. *Salman MM, Kitchen P, Halsey A, Wang MX, Törnroth-Horsefield S, Conner AC, Badaut J, Iliff JJ, Bill RM* (2022) Emerging roles for dynamic aquaporin-4 subcellular relocalization in CNS water homeostasis. *Brain* 145(1): 64–75.
<https://doi.org/10.1093/brain/awab311>

TGN-020, Inhibitor of the Water Channel Aquaporin-4, Accelerates Nigrostriatal Neurodegeneration in the Rat Model of Parkinson's Disease

K. V. Lapshina^a, *, Yu. Yu. Abramova^a, M. A. Guzeev^a, and I. V. Ekimova^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, Russia*

**e-mail: ksenia.lapshina@gmail.com*

The water channel aquaporin-4 (AQP-4) plays a very important role in the mechanisms involved in water homeostasis in the brain and participates in clearance of brain parenchyma from various metabolites, including amyloidogenic proteins that contribute to the development of neurodegenerative diseases. The aim of this work was to reveal the effect of pharmacological inhibition of the AQP-4 water channel in the brain on the rate of neurodegeneration and compensatory processes in the nigrostriatal system in the lactacystin model of Parkinson's disease (PD) in rats. The PD model in male Wistar rats was reproduced using microinjections of the specific proteasome inhibitor lactacystin into the substantia nigra pars compacta (SNpc). To suppress the activity of AQP-4, an inhibitor TGN-020 was used. It was injected into the cerebrospinal fluid of the lateral ventricle of the brain. The immunohistochemical methods and behavioral tests to assess motor dysfunction were applied. The lactacystin-induced PD model was characterized by a pre-threshold (compared with the level of the clinical stage) level of death of dopamine (DA)-ergic neurons in the SNpc (27%) and their axons in the dorsal striatum (19%). Changes in the level of the key enzyme of DA synthesis tyrosine hydroxylase (TH) in the neurons of SNpc and signs of motor dysfunction were absent. Such pathophysiological changes are characteristic of the preclinical stage of PD. The use of TGN-020 in the PD model accelerated the transition from the preclinical to the clinical stage of PD, as evidenced by the progression of neurodegeneration in the nigrostriatal system, the weakening of compensatory processes and the development of PD-like motor symptoms. The data obtained indicate that AQP-4 plays an important role in the molecular mechanisms that protect the brain from neurotoxic factors and a decrease in its activity can lead to disruption of the functioning of the glymphatic system. The AQP-4 water channel may prove to be a promising therapeutic target for neuroprotection in PD and other neurodegenerative diseases.

Keywords: aquaporin-4, ubiquitin-proteasome system, glymphatic system, Parkinson's disease, neurodegeneration, tyrosine hydroxylase, motor dysfunction

ВЫСОКОАФФИННЫЙ $K_v1.2$ -СЕЛЕКТИВНЫЙ ПЕПТИД

© 2022 г. А. М. Гиголаев¹, Э. Л. Пиньейро-Жуниор², С. Пеньёр²,
Я. Титгат², А. А. Василевский^{1,3,*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

²Лёвенский университет, Лёвен, Бельгия

³Московский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Россия

*E-mail: avas@ibch.ru

Поступила в редакцию 22.09.2022 г.

После доработки 28.10.2022 г.

Принята к публикации 30.10.2022 г.

Изоформа потенциал-чувствительных калиевых каналов $K_v1.2$ представляет интерес, поскольку мутации в ее гене ассоциированы с различными заболеваниями, например атаксией и эпилепсией. Для изучения функции $K_v1.2$ в норме и патологии необходимы селективные лиганды. В нашей работе мы получили такой лиганд на основе известного пептидного токсина скорпиона – харибдотоксина (ChTx, α -KTxl.1) из яда *Leiurus hebraeus* – путем введения в его структуру одной аминокислотной замены M29I. Пептид ChTx_M29I был получен в бактериальной системе экспрессии. Его фармакологическая характеристика проводилась на ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих панель каналов K_v1 человека. Было обнаружено, что по сравнению с исходным токсином пептид ChTx_M29I менее аффинен к каналам $K_v1.1$, 1.3 и 1.6, при этом в отношении $K_v1.2$ его активность многократно возросла. Мы связываем такой эффект со взаимодействием пептида с определенным остатком канала (V381 у $K_v1.2$). Если в этой позиции находится сравнительно небольшой остаток, то образуется выгодный контакт, повышающий аффинность. Изученный нами пептид ChTx_M29I представляет собой один из самых высокоаффинных (со значением полумаксимальной ингибирующей концентрации $IK_{50} \approx 6$ пМ) и высокоселективных лигандов $K_v1.2$ (аффинность в отношении других изоформ ниже в 680 раз и более).

Ключевые слова: потенциал-зависимый калиевый канал, эпилепсия, нейротоксин, блокатор калиевых каналов

DOI: 10.31857/S0869813922120056

Потенциал-чувствительные калиевые каналы (K_v) представляют собой трансмембранные белки и содержат четыре основные α -субъединицы [1]. Каждая α -субъединица состоит из цитоплазматического домена T1 и шести трансмембранных спиралей (S1–S6). Спирали S1–S4 образуют потенциал-чувствительный домен, где собственно сенсором потенциала является спираль S4. В ее структуре можно выделить нехарактерные для внутримембранного пространства аминокислотные остатки (а. о.) K и R, которые в ответ на изменение потенциала вызывают движение всей спирали, что в итоге регулирует открытие и закрытие канала. Спирали S5 и S6 всех четырех α -субъединиц образуют поровый домен, в ко-

тором можно выделить селективный фильтр, содержащий консервативную последовательность TVGYG – она взаимодействует с ионами K^+ .

В геноме человека обнаружено 40 генов α -субъединиц K_V , что делает эту группу самой крупной среди ионных каналов. В частности, каналы подсемейства K_V1 широко представлены в мозге млекопитающих, особенно распространены $K_V1.1$, 1.2, 1.4 и 1.6 [2]. Эти изоформы каналов могут образовывать как гомо-, так и гетеромеры, что влияет на их характеристики [3, 4]. В основном изучению доступны гомотетрамерные каналы из-за ограничений экспериментальных систем, в которых сложно контролировать экспрессию гетеромерных каналов.

Изоформа каналов $K_V1.2$ представляет особый интерес, поскольку, во-первых, среди остальных изоформ K_V1 она сравнительно равномерно экспрессирована в центральной нервной системе, а во-вторых, может образовывать как функциональные гомомерные, так и гетеромерные каналы с другими K_V1 [3]. С мутациями этой изоформы связаны несколько заболеваний, таких как атаксия и эпилепсия [5, 6]. Для изучения функции $K_V1.2$ в норме и патологии нужны селективные и высокоаффинные лиганды.

Одним из богатых источников лигандов K_V является яд скорпионов. Из яда различных видов скорпионов было выделено множество пептидных блокаторов K_V (КТх), согласно базе данных *Kalium* их насчитывается около 200 [7]. По аминокислотной последовательности их разделяют на несколько семейств: α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, κ - и λ -КТх. Самым крупным и изученным является семейство α -КТх, оно включает пептиды длиной ~20–40 а. о., имеющие пространственную укладку цистеин-стабилизированных α -спирали и β -слоя (CSc α / β). Также для них характерно наличие так называемой “функциональной диады” из а. о. К и Y, где К физически блокирует пору канала, а Y взаимодействует с его внешним вестибулем [8].

Харибдотоксин (ChTx, α -КТх1.1) – это классический токсин из яда скорпиона *Leiurus hebraeus*, который был изучен на многих каналах. Он является высокоаффинным и селективным по отношению к каналам $K_V1.3$, а также кальций-активируемым калиевым каналам $K_{Ca1.1}$ и $K_{Ca3.1}$ [9, 10]. В ходе исследований взаимодействия ChTx с различными калиевыми каналами в лаборатории Miller был получен ряд производных этого токсина. Наше внимание привлек пептид с заменой M29I [11]. Было показано, что если в K_V дрозифилы Shaker внести замену T449F, аффинность ChTx_M29I падает в 1650 раз по сравнению с обычным ChTx. В каналах человека в аналогичной позиции находятся различные а. о., в том числе и крупные ароматические. Поэтому мы решили проверить, как данная мутация повлияет на аффинность токсина по отношению к каналам человека.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение рекомбинантного белка

ChTx_M29I был получен по стандартному протоколу, который мы использовали в предыдущих работах [12]. В бактериальной системе экспрессии велась наработка пептида в составе гибрида, содержащего вспомогательный белок тиоредоксин (Trx) [13], сайт гидролиза легкой цепи энтеропептидазы человека и гексагистидиновую последовательность для очистки белка при помощи аффинной хроматографии.

Клонирование целевого гена

Последовательность ДНК, кодирующая ChTx_M29I, была получена в результате двухэтапной ПЦР с использованием синтетических олигонуклеотидов. На первом этапе четыре праймера использовались для получения полноразмерной копии гена

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для получения полноразмерного гена, кодирующего производное ChTx_M29I

Название	Последовательность (5'–3')
F1	AGCTGCGGT <u>ACCGACGACGACGACCGTC</u> AGTTTACCAATGTGAGCTGC
F2	GAGCGTTTGCCAGCGTCTGCATAACACCTCTCGCGGCAAGTGTATTAATA
R1	ACTTGAGGATCCTTAAGAATAACAACGGCATTCTTATTAATACACTTGC
R2	CGCTGGCAAACGCTCCAACATTCTTTAGACGTGGTGCAGCTCACATTGGT

Сайты рестрикции обозначены подчеркиванием, жирным выделен сайт гидролиза энтеропептидазы.

(табл. 1). На втором этапе реакционная смесь из первого этапа использовалась в качестве матрицы для амплификации с праймерами F1 и R1. Полученная ДНК была клонирована в экспрессионный вектор pET-32b (Novagen) по сайтам KpnI и BamHI.

Экспрессия и очистка химерного белка

Экспрессионный штамм *Escherichia coli* SHuffle T7 Express (New England Biolabs) был трансформирован вектором, несущим ген ChTx_M29I, рост клеточной биомассы в среде LB проходил при температуре 37°C до середины экспоненциальной фазы. Экспрессия была индуцирована добавлением изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом до концентрации 0.4 мМ. Далее клеточная биомасса культивировалась при комнатной температуре в течение 16 ч. Затем клетки были разрушены при помощи ультразвука, а клеточный лизат нанесли на колонку со смолой HisPur Cobalt Resin (Thermo Fisher Scientific). Гибридный белок очищали по протоколу производителя смолы.

Очистка целевого пептида

Очищенный химерный белок растворяли в 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0) до концентрации 1 мг/мл. Ферментативный гидролиз проводился при помощи легкой цепи энтеропептидазы человека (1 МЕ фермента на 1 мг белка) при 37°C в течение 16 ч [14]. Полученный гидролизат подвергался разделению при помощи обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–60% за 60 мин) на колонке Jupiter C₅ (4.6 × 250 мм, Phenomenex). Детекция велась по оптическому поглощению элюата, а искомое соединение определялось по сравнению расчетных и экспериментально полученных масс, определенных при помощи матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрия

Для измерения молекулярной массы использовали спектрометр Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik), как описано ранее [15]. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (Sigma-Aldrich). Эксперименты проводились в режиме рефлектрона с погрешностью измерения масс не более 100 ppm. Масс-спектры анализировали с помощью программного обеспечения Data Analysis 4.3 и Data AnalysisViewer 4.3 (Bruker).

Электрофизиология

Эксперименты были выполнены по протоколам, опубликованным ранее [12]. Потенциал-чувствительные калиевые каналы человека (K_v1.1 (GenBank: NM000217),

1.2 (GenBank: NM004974), 1.3 (GenBank: NM002232) и 1.6 (GenBank: NM002235) были экспрессированы в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*. Для этого были получены мРНК, кодирующие каналы, при помощи набора mMESSAGE mMACHINE T7 (Thermo Fisher Scientific). Затем полученные мРНК были инъецированы в ооциты с использованием микроинжектора (Drummond Scientific).

Запись токов, проходящих через мембрану ооцитов, велась при комнатной температуре методом двухэлектродной фиксации потенциала. Данные были получены с использованием усилителя GeneClamp 500 и программного обеспечения Clampex 9 (Molecular Devices). Потенциал покоя был равен -90 мВ, открытие каналов вызывалось деполяризацией мембраны до 0 мВ в течение 500 мс, затем в течение еще 500 мс потенциал поддерживался на уровне -50 мВ и возвращался к потенциалу покоя.

Для построения кривой зависимости ингибирования тока от концентрации токсина исследуемый пептид был последовательно разведен и добавлен в камеру с ооцитом, где достигалась конечная исследуемая концентрация. Полученные данные были анализированы по уравнению Хилла:

$$y = \frac{100}{1 + \left(\frac{ИК_{50}}{C_{\text{пептида}}} \right)^h},$$

где y – ингибирование тока в %, $C_{\text{пептида}}$ – концентрация исследуемого пептида, $ИК_{50}$ – полумаксимальная ингибирующая концентрация, h – коэффициент Хилла.

Все данные были получены как минимум в трех независимых экспериментах ($n \geq 3$). Обработка результатов проводилась в программе Origin (OriginLab Corporation).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантного пептида ChTx_M29I

Одним из основных способов получения пептидов с аминокислотными заменами является использование бактериальных систем экспрессии. Для того, чтобы в бактериях наработать нужный нам пептид, необходимо получить генетическую конструкцию, его кодирующую. Мы клонировали ген, кодирующий ChTx_M29I, в экспрессионный вектор рЕТ-32b по сайтам рестрикции KpnI и BamHI. Полученной конструкцией мы трансформировали штамм *E. coli* SHuffle T7 Express, который предназначен для экспрессии дисульфид-богатых белков [16]. Целевой пептид нарабатывался в виде слитного белка с Ttx, который был очищен с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. Слитный белок затем подвергся ферментативному гидролизу по сайту энтерокиназы человека, а гидролизат разделялся при помощи ОФ-ВЭЖХ (рис. 1). Определение пика на хроматограмме, соответствующего пептиду ChTx_M29I, велось при помощи МАЛДИ масс-спектрометрии. Выход целевого пептида составил 4 мг с 1 литра питательной среды.

Электрофизиологическое исследование полученного пептида

Фармакологическую характеристику пептида ChTx_M29I мы провели при помощи метода двухэлектродной фиксации потенциала на панели каналов K_V1 . По сравнению с обычным ChTx он оказался намного менее аффинным по отношению к каналам $K_V1.1$ и 1.6 : в концентрации 2 мкМ он блокирует эти каналы на $3.1 \pm 2.7\%$ и $9.6 \pm 0.6\%$ соответственно (рис. 2, табл. 2). Среди K_V ChTx проявляет селективность по отношению к каналу $K_V1.3$ (табл. 2), в то время как полученный мутант оказался в 1500 раз более аффинным по отношению к каналу $K_V1.2$ ($ИК_{50} = 6 \pm 0.4$ пМ) и в 20 раз менее аффинным к $K_V1.3$ ($ИК_{50} = 4.1 \pm 0.8$ нМ). Таким образом, соотноше-

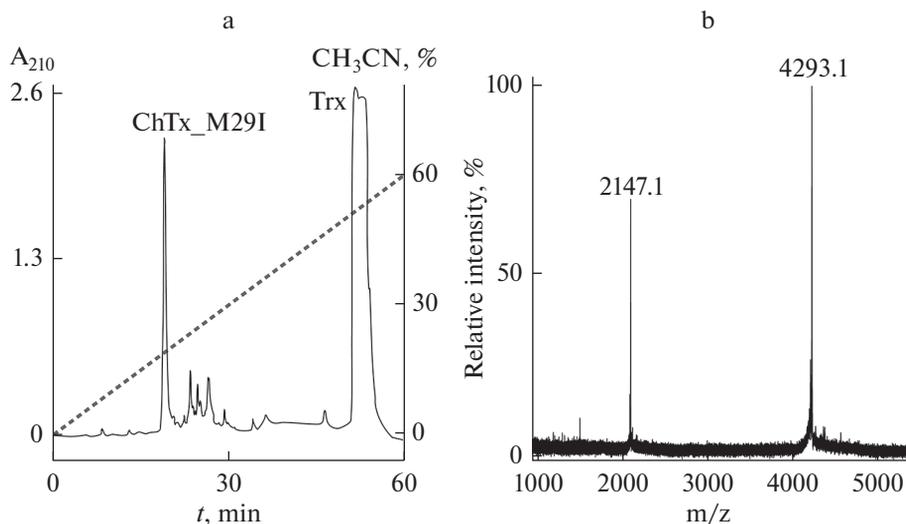


Рис. 1. (а) – хроматографическое разделение продуктов гидролиза гибридного белка энтеропептидазой. (б) – спектр очищенного ChTx_M29I, полученный при помощи МАЛДИ масс-спектрометрии в режиме рефлектрона, показаны соответствующие моноизотопные массы. Расчетная моноизотопная масса [M+H]⁺ составляет 4292.9 Да, экспериментально измеренная – 4293.1 Да.

ние между ИК₅₀ по отношению к каналам K_V1.2 и 1.3 составило 680 раз, что делает ChTx_M29I одним из наиболее селективных лигандов K_V1.2.

Ранее Miller и соавт. было предположено, что имеет место взаимодействие между а. о. токсина ChTx (M29) и канала Shaker (T449; табл. 3). При этом формируется высокоаффинный комплекс (K_d ≈ 0.063 нМ) [11]. При введении замен в токсин (M29I) и канал (T449F) получался менее стабильный комплекс (K_d ≈ 1100 нМ). То есть введение большого ароматического а. о. в положение 449 канала приводит к чрезвычайному ухудшению связывания производного ChTx_M29I. В случае изоформ K_V1 человека ухудшение связывания этого производного с каналами K_V1.1 и 1.6 не является неожиданным, так как в соответствующем положении находится большой ароматический а. о. (Y379 и Y429 соответственно; табл. 3).

В случае K_V1.3 мы также наблюдаем снижение аффинности, что аналогично можно связать с наличием крупного а. о. (H451) в этой позиции. В свою очередь, у канала K_V1.2 в этом положении находится сравнительно небольшой гидрофобный а. о. (V381), Ван-дер-ваальсовы взаимодействия с ним, по-видимому, объясняют

Таблица 2. Фармакологическая характеристика хариботоксина (ChTx) и его мутанта ChTx_M29I

Пептид	Последовательность	K _V 1.1	K _V 1.2	K _V 1.3	K _V 1.6
ChTx	ZFTNVVSC ¹ TTTSKEC ² W ³ SV ⁴ C ⁵ QRLHNTSRGK ⁶ CM ⁷ NKK ⁸ RC ⁹ YS	1500	9	0.19	22
ChTx_M29I	QFTNVVSC ¹ TTTSKEC ² W ³ SV ⁴ C ⁵ QRLHNTSRGK ⁶ C ⁷ NKK ⁸ RC ⁹ YS	2000/3.1 ¹	0.006	4.1	2000/9.6

¹ А/Б, где А – концентрация пептида, Б – процент ингибирования. Светло-серым выделены остатки цистеина, темно-серым обозначена позиция, в которую вносилась замена. Z обозначает остаток пироглутаминовой кислоты. Указаны значения K_d (для ChTx) [10, 17] и ИК₅₀ (для ChTx_M29I) в нМ.

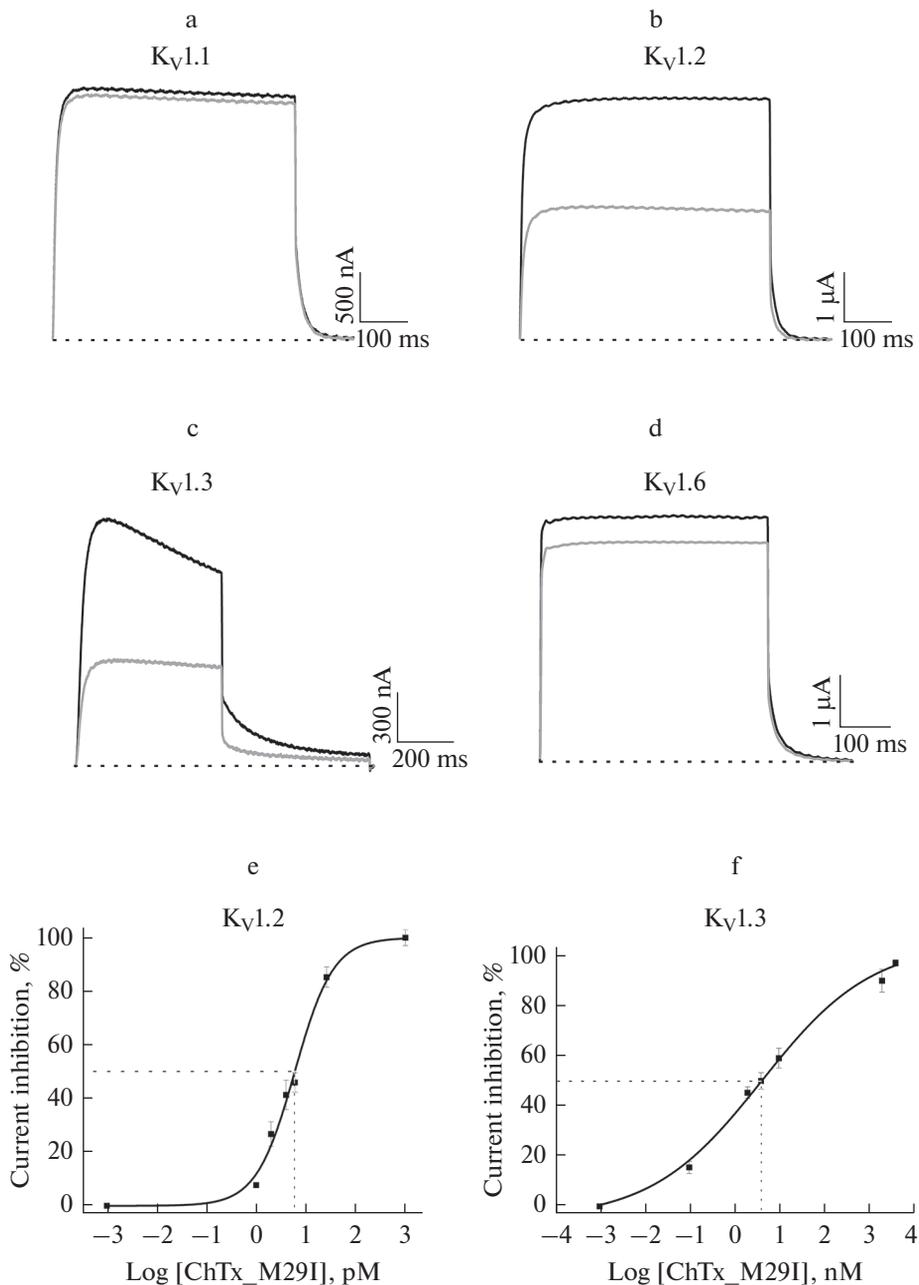


Рис. 2. Фармакологическая характеристика пептида ChTx_M29I. (a–d) – записи токов через мембрану ооцитов в контроле (черные кривые) и в присутствии пептида (2 мкМ для Kv1.1 и 1.6, 6 пМ для Kv1.2 и 4 нМ для Kv1.3; серые кривые). (e, f) – кривые доза–ответ для каналов Kv1.2 и 1.3, пунктирными линиями показаны значения ИК₅₀. Коэффициенты Хилла (*h*) составляют 1.1 ± 0.1 и 0.35 ± 0.02 соответственно.

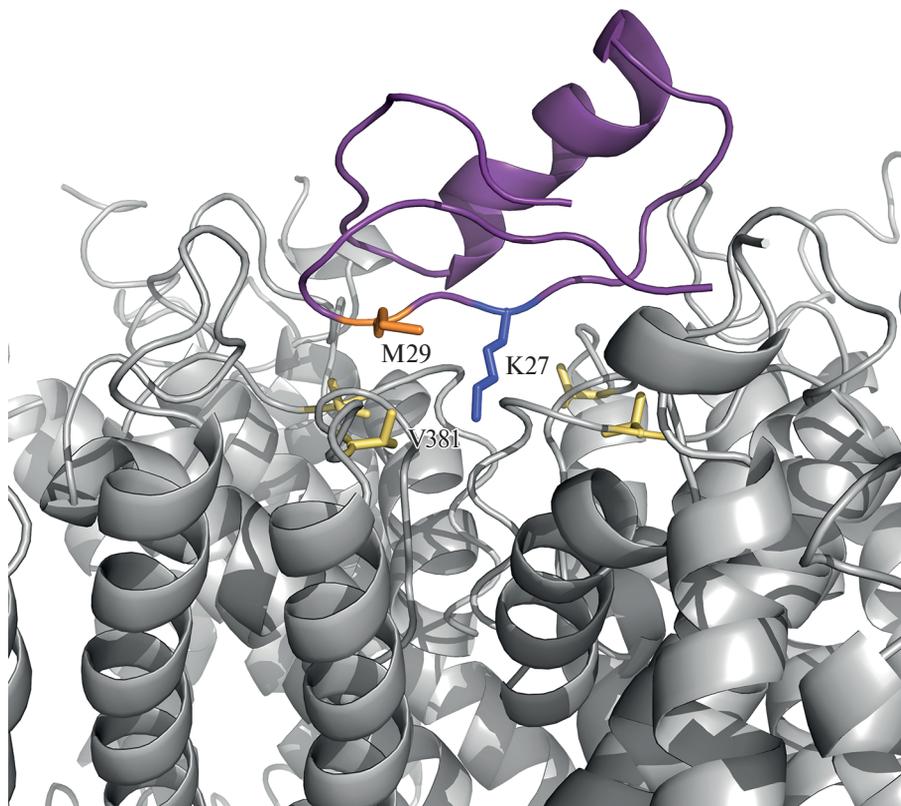


Рис. 3. Структура комплекса ChTx с каналом K_v1.2/2.1. Канал показан серым, а. о. V381 выделен желтым; токсин показан фиолетовым, K27 выделен синим, M29 – оранжевым.

высокую аффинность ChTx_M29I к данному каналу. Для объяснения наблюдаемых эффектов можно рассмотреть уже известную структуру комплекса ChTx с химерой K_v1.2/2.1 [18]. Мы предполагаем, что ChTx_M29I располагается в вестибуле поры канала так же, как и сам ChTx. На рис. 3 можно видеть, что а. о. M29 токсина и V381 канала сближены в пространстве. Соответственно, если в этом положении у канала находится большой ароматический а. о., то это приводит к стерическому затруднению и уменьшению аффинности.

Таблица 3. Сравнение аминокислотных последовательностей порового региона канала Shaker и K_v1

Shaker	416	FAEAGSENSFFKSI PDAFWWAVVTMTTVGYGDMTPVGVW	454
hK _v 1.1	346	FAEAEEAESHFSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMYPVTIG	384
hK _v 1.2	348	FAEADERESQFP SIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMVPTTIG	386
hK _v 1.3	418	FAEADDPTS GFSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMHPVTIG	456
hK _v 1.6	396	FAEADDDDSLFP SIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMYPMTVG	434

Различающиеся а. о. обозначены серым фоном, полужирным выделены ключевые а. о., предположительно взаимодействующие с а. о. токсина M/129.

Таблица 4. Список известных полипептидных лигандов, селективно воздействующих на $K_{V1.2}$

	$K_{V1.1}$	$K_{V1.2}$	$K_{V1.3}$	$K_{V1.6}$	Ссылки
ChTx_M29I	2000/3 ¹	0.006 ²	4.1	2000/10	Эта работа
MeКТх11-1	2110	0.19	67	8900	[19]
MeКТх11-3	130	3.1	78	910	[19]
Css20	>10 ³	1.3	7.2	4	[23]
Toxin II.10.4	>10	3.6	~72		[24]
Toxin II.10.5	>10	0.3	8.3		[24]
Toxin II.12.5	> 0	0.7	26.2		[24]
Toxin II.12.8	4.8	2.9	>10		[24]
TsTX-K-alpha	1000/85	0.2	1000/85	1000/94	[25, 26]
Tst26	>10	1.9	10.7		[27]
Pi-1	>5000	0.44	9.7		[28, 29]
Maurotoxin	45	0.8	180		[30]
Pi-4	>10000	0.008	>10000		[22]
Urotoxin	253	0.16	91		[20]
OdK1	>400	183	>400		[31]
Kbot1	145	2.5	15		[32]
CoTx1	24400	27	5300		[33]
OsK-2	>250	97	>250		[34]
Ts15	500/10	196	508	500/20	[35]
MMTX	>50000	15.6	12500		[21]
Vcs3a	405	0.03	74	1.31	[36]
Vcs4a	3000/54	173	1007	2246	[36]
RIIIJ	~4000	33	~10000	~8000	[37]
RIIIK	>10000	280	>10000	5000/10	[38, 39]
α -DTX	9.4	0.38	>100	9	[40–42]
DTX-I	3.1	0.13	4533	10/26	[43–45]

¹ А/Б, где А – концентрация пептида в нМ, Б – процент ингибирования. ² ИК₅₀, нМ. ³ лиганд не действует в концентрации больше указанного значения в нМ. ⁴ нет данных.

В нашей лаборатории ранее был получен и охарактеризован токсин из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* MeКТх11-1 (α -КТх1.16), проявляющий высокую аффинность к $K_{V1.2}$ (ИК₅₀ \approx 0.2 нМ) [19]. Однако этот токсин уступает и по аффинности, и по селективности рассматриваемому в данной статье пептиду ChTx_M29I. У MeКТх11-1 в структуре в положении 29 находится М, что наталкивает на мысль о получении более селективного лиганда при внесении такой же замены M29I.

Для сопоставления наших результатов со сведениями из литературы с помощью базы данных *Kalium* был составлен список селективных лигандов канала $K_{V1.2}$ (табл. 4). Большинство из них – это токсины скорпионов, но также можно отметить несколько токсинов актиний, конусов и змей. Общая наблюдаемая тенденция заключается в том, что большинство лигандов не обладают высокой селективностью. Помимо MeКТх11-1, стоит упомянуть уротоксин [20] и мезомартоксин (ММТХ) [21], обладающих сопоставимой селективностью с ChTx_M29I, однако аффинность которых существенно ниже. И наконец, Pi-4 из яда скорпиона *Pandi-*

nus imperator [22] обладает сходной аффинностью и даже превосходит ChTx_M29I по селективности, однако активность этого пептида не была исследована в отношении K_v1.6.

Мутации в гене канала K_v1.2 могут приводить к эпилептической энцефалопатии [6]. В основном, это мутации с потерей функции, когда канал теряет способность открываться в ответ на деполяризующий стимул. Однако известны патогенные мутации K_v1.2 с приобретением функции, которые вызывают смещение порогового потенциала активации каналов в отрицательную область. В таком случае как раз могли бы найти применение селективные блокаторы в качестве фармакологического агента, корректирующего работу мутантного канала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы продемонстрировали, что одна аминокислотная замена может привести к значительному изменению аффинности и селективности лиганда калиевого канала на примере хорошо изученного хариботоксина (ChTx). Замена M29I привела к ухудшению аффинности токсина по отношению к каналам K_v1.1, 1.3 и 1.6, а к каналу K_v1.2 мы наблюдали увеличение аффинности более чем в 1500 раз (ИК₅₀ ≈ 6 пМ). Полученный пептид в итоге оказался высокоаффинным и высоко-селективным лигандом канала K_v1.2.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана РФФ (проект № 20-44-01015; электрофизиологические исследования) и РФФИ (проект № 20-34-90158; получение пептида).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

А.М.Г. и А.А.В. спланировали исследование. А.М.Г. выполнил биохимические эксперименты и получил рекомбинантные пептиды. С.П. и Э.Л.П.-Ж. выполнили электрофизиологические эксперименты. А.А.В. руководил биохимическими экспериментами. Я.Т. руководил электрофизиологическими экспериментами. А.М.Г. и А.А.В. написали статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hille B* (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
2. *Zeisel A, Hochgerner H, Lönnerberg P, Johnsson A, Memic F, Zwan J van der, Häring M, Braun E, Borm LE, Manno G La, Codeluppi S, Furlan A, Lee K, Skene N, Harris KD, Hjerling-Leffler J, Arenas E, Ernfors P, Marklund U, Linnarsson S* (2018) Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 174:999–1014.e22. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.06.021>
3. *Shamotienko OG, Parcej DN, Dolly JO* (1997) Subunit combinations defined for K⁺ channel Kv1 subtypes in synaptic membranes from bovine brain. *Biochemistry* 36: 8195–8201. <https://doi.org/10.1021/bi970237g>
4. *Dodson PD, Barker MC, Forsythe ID* (2002) Two heteromeric Kv1 potassium channels differentially regulate action potential firing. *J Neurosci* 22: 6953–6961. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-16-06953.2002>
5. *Pena SDJ, Coimbra RLM* (2015) Ataxia and myoclonic epilepsy due to a heterozygous new mutation in KCNA2: proposal for a new channelopathy. *Clin Genet* 87: e1–e3. <https://doi.org/10.1111/CGE.12542>

6. Syrbe S, Hedrich UBS, Riesch E, Djémié T, Müller S, Möller RS, Maher B, Hernandez-Hernandez L, Synofzik M, Caglayan HS, Arslan M, Serratos JM, Nothnagel M, May P, Krause R, Löffler H, Detert K, Dorn T, Vogt H, Krämer G, Schöls L, Mullis PE, Linnankivi T, Lehesjoki AE, Sterbova K, Craiu DC, Hoffman-Zacharska D, Korff CM, Weber YG, Steinlin M, Gallati S, Bertsche A, Bernhard MK, Merckenschlager A, Kiess W, Gonzalez M, Züchner S, Palotie A, Suls A, De Jonghe P, Helbig I, Biskup S, Wolff M, Maljevic S, Schüle R, Sisodiya SM, Weckhuysen S, Lerche H, Lemke JR (2015) De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 2015 474 47: 393–399. <https://doi.org/10.1038/ng.3239>
7. Tabakmakher VM, Krylov NA, Kuzmenkov AI, Efremov RG, Vassilevski AA (2019) Kalium 2.0, a comprehensive database of polypeptide ligands of potassium channels. *Sci Data* 2019 61 6: 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0074-x>
8. Mouhat S, De Waard M, Sabatier JM (2005) Contribution of the functional dyad of animal toxins acting on voltage-gated K_v1-type channels. *J Pept Sci* 11: 65–68.
9. MacKinnon R, Miller C (1988) Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Gen Physiol* 91: 335. <https://doi.org/10.1085/JGP.91.3.335>
10. Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33: 6834–6839. <https://doi.org/10.1021/bi00188a012>
11. Naranjo D, Miller C (1996) A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16: 123–130. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80029-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80029-X)
12. Berkut AA, Usmanova DR, Peigneur S, Oparin PB, Mineev KS, Odintsova TI, Tytgat J, Arseniev AS, Grishin EV, Vassilevski AA (2014) Structural similarity between defense peptide from wheat and scorpion neurotoxin permits rational functional design. *J Biol Chem* 289: 14331–14340. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530477>
13. McCoy J, LaVallie E (2001) Expression and Purification of Thioredoxin Fusion Proteins. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc. Hoboken NJ USA. 16.8.1–16.8.14
14. Gasparian ME, Ostapchenko VG, Schulga AA, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP (2003) Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Protein Exp Purif* 31(1): 133–139. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00159-1](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00159-1)
15. Kuzmenkov AI, Sachkova MY, Kovalchuk SI, Grishin E V, Vassilevski AA (2016) *Lachesana tarabaevi*, an expert in membrane-active toxins. *Biochem J* 473: 2495–2506. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160436>
16. Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M (2012) SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact* 11: 56. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>
17. Takacs Z, Toups M, Kollwe A, Johnson E, Cuello LG, Driessens G, Biancalana M, Koide A, Ponte CG, Perozo E, Gajewski TF, Suarez-Kurtz G, Koide S, Goldstein SAN (2009) A designer ligand specific for K_v1.3 channels from a scorpion neurotoxin-based library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 22211–22216. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0910123106>
18. Banerjee A, Lee A, Campbell E, MacKinnon R (2013) Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel. *Elife* 2: e00594. <https://doi.org/10.7554/eLife.00594>
19. Kuzmenkov AI, Nekrasova O V., Peigneur S, Tabakmakher VM, Gigoлаев AM, Fradkov AF, Kudryashova KS, Chugunov AO, Efremov RG, Tytgat J, Feofanov AV, Vassilevski AA (2018) K_v1.2 channel-specific blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom: Structural basis of selectivity. *Neuropharmacology* 143: 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.030>
20. Luna-Ramírez K, Bartok A, Restano-Cassulini R, Quintero-Hernández V, Coronas FIV, Christensen J, Wright CE, Panyi G, Possani LD (2014) Structure, molecular modeling, and function of the novel potassium channel blocker urotoxin isolated from the venom of the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*. *Mol Pharmacol* 86: 28–41. <https://doi.org/10.1124/MOL.113.090183>
21. Wang X, Umetsu Y, Gao B, Ohki S, Zhu S (2015) Mesomartoxin, a new K(v)1.2-selective scorpion toxin interacting with the channel selectivity filter. *Biochem Pharmacol* 93: 232–239. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2014.12.002>
22. M'Barek S, Mosbah A, Sandoz G, Fajloun Z, Olamendi-Portugal T, Rochat H, Sampieri F, Guijarro JI, Mansuelle P, Delepierre M, De Waard M, Sabatier JM (2003) Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K⁺ channels. *Eur J Bio-*

- chem 270: 3583–3592.
<https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2003.03743.X>
23. Corzo G, Papp F, Varga Z, Barraza O, Espino-Solis PG, Rodríguez de la Vega RC, Gaspar R, Panyi G, Possani LD (2008) A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Biochem Pharmacol* 76: 1142–1154.
<https://doi.org/10.1016/J.BCP.2008.08.018>
 24. Olamendi-Portugal T, Bartok A, Zamudio-Zuñiga F, Balajthy A, Becerril B, Panyi G, Possani LD (2016) Isolation, chemical and functional characterization of several new K⁽⁺⁾-channel blocking peptides from the venom of the scorpion *Centruroides tecomanus*. *Toxicon* 115: 1–12.
<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2016.02.017>
 25. Cerni FA, Pucca MB, Peigneur S, Cremonese CM, Bordon KCF, Tytgat J, Arantes EC (2014) Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K⁺ channel toxins isolated through an improved *Tityus serrulatus* venom purification procedure. *Toxins (Basel)* 6: 892–913.
<https://doi.org/10.3390/TOXINS6030892>
 26. Possani LD, Selisko B, Gurrola GB (1999) Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺-channels. *Perspect Drug Discov Des* 150 (15): 15–40.
<https://doi.org/10.1023/A:1017062613503>
 27. Papp F, Batista CVF, Varga Z, Herceg M, Román-González SA, Gaspar R, Possani LD, Panyi G (2009) Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. *Toxicon* 54: 379–389.
<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2009.05.023>
 28. Fajloun Z, Carlier E, Lecomte C, Geib S, Di Luccio E, Bichet D, Mabrouk K, Rochat H, De Waard M, Sabatier JM (2000) Chemical synthesis and characterization of Pi1, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* active on K⁺ channels. *Eur J Biochem* 267: 5149–5155.
<https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2000.01577.X>
 29. Péter M, Varga Z, Panyi G, Bene L, Damjanovich S, Pieri C, Possani LD, Gáspár R (1998) *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated K⁺ channels in human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 621–625.
<https://doi.org/10.1006/BBRC.1997.8018>
 30. Kharrat R, Mansuelle P, Sampieri F, Crest M, Oughideni R, Van Rietschoten J, Martin-Eauclaire MF, Rochat H, El Ayeub M (1997) Maurotoxin, a four disulfide bridge toxin from *Scorpio maurus* venom: purification, structure and action on potassium channels. *FEBS Lett* 406: 284–290.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00285-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00285-8)
 31. Abdel-Mottaleb Y, Clynen E, Jalali A, Bosmans F, Vatanpour H, Schoofs L, Tytgat J (2006) The first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion *Odonthobuthus doriae*. *FEBS Lett* 580: 6254–6258.
<https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.10.029>
 32. Mahjoubi-Boubaker B, Crest M, Khalifa R Ben, El Ayeub M, Kharrat R (2004) Kbot1, a three disulfide bridges toxin from *Buthus occitanus tunetanus* venom highly active on both SK and Kv channels. *Peptides* 25: 637–645.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.02.017>
 33. Jouirou B, Mosbah A, Visan V, Grissmer S, M'Barek S, Fajloun Z, Van Rietschoten J, Devaux C, Rochat H, Lippens G, El Ayeub M, De Waard M, Mabrouk K, Sabatier JM (2004) Cobatoxin I from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K⁺ channels. *Biochem J* 377: 37–49.
<https://doi.org/10.1042/BJ20030977>
 34. Dudina EE, Korolkova YV, Bocharova NE, Koshelev SG, Egorov TA, Huys I, Tytgat J, Grishin EV (2001) OsK2, a new selective inhibitor of Kv1.2 potassium channels purified from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 841–847.
<https://doi.org/10.1006/BBRC.2001.5492>
 35. Cologna CT, Peigneur S, Rosa JC, Selistre-de-Araujo HS, Varanda WA, Tytgat J, Arantes EC (2011) Purification and characterization of Ts15, the first member of a new α -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 58: 54–61.
<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2011.05.001>
 36. Orts DJB, Peigneur S, Madio B, Cassoli JS, Montandon GG, Pimenta AMC, Bicudo JEPW, Freitas JC, Zaharenko AJ, Tytgat J (2013) Biochemical and electrophysiological characterization of two sea anemone type I potassium toxins from a geographically distant population of *bunodosoma caissarum*. *Mar Drugs* 11: 655–679.
<https://doi.org/10.3390/md11030655>
 37. Chen P, Dendorfer A, Finol-Urdaneta RK, Terlau H, Olivera BM (2010) Biochemical characterization of kappaM-RIIIIJ, a Kv1.2 channel blocker: evaluation of cardioprotective effects of kappaM-conotoxins. *J Biol Chem* 285: 14882–14889.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M109.068486>
 38. Ferber M, Sporning A, Jeserich G, DeLaCruz R, Watkins M, Olivera BM, Terlau H (2003) A novel conus peptide ligand for K⁺ channels. *J Biol Chem* 278: 2177–2183.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M205953200>

39. Ferber M, Al-Sabi A, Stocker M, Olivera BM, Terlau H (2004) Identification of a mammalian target of κ M-conotoxin RIIIK. *Toxicon* 43: 915–921.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.12.010>
40. Tytgat J, Debont T, Carmeliet E, Daenens P (1995) The alpha-dendrotoxin footprint on a mammalian potassium channel. *J Biol Chem* 270: 24776–24781.
<https://doi.org/10.1074/JBC.270.42.24776>
41. Swanson R, Marshall J, Smith JS, Williams JB, Boyle MB, Folander K, Luneau CJ, Antanavage J, Oliva C, Buhrow SA, Bennet C, Stein RB, Kaczmarek LK (1990) Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron* 4: 929–939.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90146-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90146-7)
42. Hurst RS, Busch AE, Kavanaugh MP, Osborne PB, North RA, Adelman JP (1991) Identification of amino acid residues involved in dendrotoxin block of rat voltage-dependent potassium channels. *Mol Pharmacol* 40.
43. Robertson B, Owen D, Stow J, Butler C, Newland C (1996) Novel effects of dendrotoxin homologues on subtypes of mammalian Kv1 potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 383: 26–30.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00211-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00211-6)
44. Hopkins WF, Demas V, Tempel BL (1994) Both N- and C-terminal regions contribute to the assembly and functional expression of homo- and heteromultimeric voltage-gated K⁺ channels. *J Neurosci* 14: 1385–1393.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01385.1994>
45. Hopkins WF, Allen ML, Houamed KM, Tempel BL (1994) Properties of voltage-gated K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes by mKv1.1, mKv1.2 and their heteromultimers as revealed by mutagenesis of the dendrotoxin-binding site in mKv1.1. *Pflugers Arch* 428: 382–390.
<https://doi.org/10.1007/BF00724522>

K_V1.2-Selective Peptide with High Affinity

A. M. Gigolaev^a, E. L. Pinheiro-Junior^b, S. Peigneur^b, J. Tytgat^b, and A. A. Vassilevski^{a, c, *}

^a*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*KU Leuven, Leuven, Belgium*

^c*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia*

*e-mail: avas@ibch.ru

The isoform of voltage-gated potassium channels K_V1.2 is of interest because mutations in its gene are associated with various diseases, such as ataxia and epilepsy. Selective ligands are needed to study the function of K_V1.2 in health and disease. In our work, we obtained such a ligand based on the known scorpion peptide toxin, charybdotoxin (ChTx, α -KTx1.1) from the venom of *Leiurus hebraeus*, by introducing a single amino acid substitution M29I into its structure. ChTx_M29I peptide was generated in a bacterial expression system. Its pharmacological characterization was carried out in *Xenopus laevis* frog oocytes expressing a panel of human K_V1 channels. We found that, compared to the parent toxin, ChTx_M29I peptide showed smaller affinity for channels K_V1.1, 1.3, and 1.6, while its activity against K_V1.2 increased manifold. We attribute this effect to the interaction of the peptide with a specific channel residue (V381 in K_V1.2). If there is a relatively small residue at this position, then an advantageous contact is formed that increases the affinity. ChTx_M29I peptide studied by us presents one of the highest affinity (with a half-maximal inhibitory concentration IC₅₀ \approx 6 pM) and selectivity among K_V1.2 ligands (affinity for other isoforms is lower by 680 times or more).

Keywords: voltage-gated potassium channel, epilepsy, neurotoxin, potassium channel blocker

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ НА РАЗМЕР ИНФАРКТА МИОКАРДА, БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У КРЫС С СИНДРОМОМ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА И ПОЛИМОРБИДНОСТЬЮ

© 2022 г. Ю. Ю. Борщев¹, Д. Л. Сонин^{1, 2}, И. Ю. Буровенко¹, В. Ю. Борщев², Ю. В. Чебуркин¹, О. В. Борщева¹, М. М. Галагудза^{1, 2, *}

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

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

Поступила в редакцию 28.08.2022 г.

После доработки 31.10.2022 г.

Принята к публикации 01.11.2022 г.

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования показали эффективность различных пробиотических штаммов при нарушениях обмена веществ, заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени, патологии иммунной системы. В меньшей степени изучены эффекты пробиотиков при нарушениях функции сердечно-сосудистой системы. Разработка и валидация новой экспериментальной модели на крысах, включающей ожирение, острый воспалительный процесс толстой кишки и антибиотик-индуцированный дисбиоз, обладающей общими характеристиками синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), стала основой для исследования влияния пробиотических препаратов на устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению с использованием модели коронароокклюзионного инфаркта *in vivo*. У крыс стока Вистар с моделированием ССВО обнаружено увеличение размера инфаркта миокарда на 24% по сравнению с контрольными животными ($p < 0.05$), а также существенные изменения лейкоформулы, биохимических и иммунологических показателей. Введение животным с ССВО смеси штаммов *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) и *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) вызвало уменьшение размера инфаркта до значения близкого к контролю. У крыс, получавших LA-5 и BB-12, при сравнении с группой с ССВО, а также с группами, получавшими другие пробиотические штаммы, также отмечена нормализация количества лейкоцитов, уровня желчных кислот, трансформирующего фактора роста- β , интерлейкинов: IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-8, фактора некроза опухолей- α , липополисахарида и моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 в крови. Полученные данные убедительно показывают перспективность дальнейшего изучения кардиотропного потенциала пробиотических микроорганизмов в трансляционных исследованиях.

Ключевые слова: сердце, ишемия, реперфузия, размер инфаркта, полиморбидность, синдром системной воспалительной реакции, цитокины, пробиотики, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

DOI: 10.31857/S0869813922120020

В настоящее время ожирение рассматривается не только как самостоятельный иммуновоспалительный процесс [1], но и признается одним из предикторов летального исхода от COVID-19 [2] с характерным паттерном гиперцитокинемии. Также известно, что наличие у пациента сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и факторов их риска повышает уязвимость к COVID-19, который, в свою очередь, может усугубить ССЗ и спровоцировать новые сердечно-сосудистые осложнения [3]. Одним из общих патогенетических звеньев вышеуказанных патологий является системный воспалительный ответ. Наиболее важными маркерами системного воспалительного ответа низкой интенсивности являются IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-10 и MCP-1, тогда как для цитокинового шторма характерно значительное увеличение концентрации в крови еще и IL-2, IL-7, IFN γ [4, 5]. Патогенез цитокинового шторма связан с избыточным эффектом цитокинов на клетки и возникающим при этом вторичном повреждении органов-мишеней, а именно печени, легких, почек и центральной нервной системы. Клиническая значимость проблемы придает дополнительный импульс к поиску общих терапевтических мишеней и инструментов для предотвращения формирующейся при системном воспалении и цитокиновом шторме полиорганной недостаточности.

В контексте связи ожирения, воспалительного процесса и изменений состава кишечной микробиоты [6] с развитием ССЗ для разработки стратегии защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения, основанной на управляемом изменении состава кишечной микробиоты с помощью пробиотических препаратов, нами была предложена новая экспериментальная модель синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) [7]. Данная модель ССВО у крыс включает в качестве базового повреждающего воздействия химически индуцированное воспаление толстой кишки на фоне первичного висцерального ожирения и антибиотик-индуцированного дисбиоза. По результатам исследования влияния различных антимикробных препаратов [8] и качественного состава жиругловодной диеты [9] у крыс с ССВО, нами были получены данные, подтверждающие положительное влияние пробиотических штаммов на устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению на модели изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу [10].

Целью данной работы стало изучение терапевтического потенциала пробиотических микроорганизмов в отношении толерантности миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению (ИРП) *in vivo*, на фоне внутрижелудочного введения смеси пробиотических лакто- и бифидобактерий, а также сахаромицетов и энтерококков. В данной работе на модели ССВО на крысах стока Wistar использовали методику коронароокклюзионного инфаркта миокарда. Основной задачей исследования являлась проверка гипотезы о влиянии пробиотических штаммов на течение локальных и системных воспалительных реакций с кардиопротективным эффектом. Дополнительной задачей являлась оценка влияния пробиотических препаратов на биохимические и иммунологические показатели.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 80 крысах самцах стока Wistar SPF-категории (Пушино) в условиях улучшенного конвенционального вивария, массой 300–350 г, в соответствии с Директивой Европейского Совета по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными, согласно дизайну эксперимента (рис. 1), утвержденного решением биоэтического комитета Института экспериментальной медицины Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова, протокол-заявка 21-09ПЗ#V1 от 21.05.2021. Животные случайным образом распределялись в одну из пяти групп ($n = 16$ в каждой группе): 1) кон-

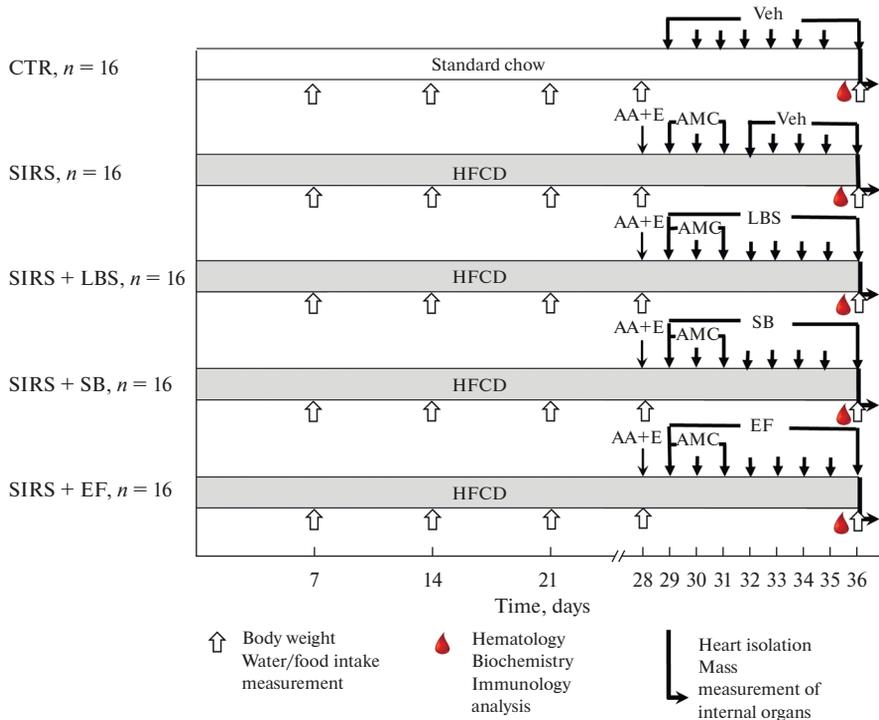


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

CTR – контроль, SIRS – синдром системной воспалительной реакции, SIRS + LBS – ССВО и смесь LA-5 и BB-12, SIRS + SB – ССВО и *S. boulardii*, SIRS + EF – ССВО и *E. faecium* L3, AA + E – смесь уксусной кислоты и этанола, HFCD – жиρούглеродная диета, Veh – физиологический раствор, AMC – смесь антимикробных препаратов.

троль (CTR) – крысы получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*; 2) синдром системного воспалительного ответа (ССВО). Крысам с первичным висцеральным ожирением, индуцированным жиρούглеродной диетой, на основе контролируемого потребления ненасыщенных жирных кислот (2 г) и сахарозы (1 г) соответственно на 1 крысу в сутки, в течение 28 дней до моделирования ССВО и далее до окончания опыта [9], осуществлялось моделирование ССВО [7]. Животным однократно ректально вводили смесь 3%-ного раствора уксусной кислоты и 3%-ного раствора этанола в физиологическом растворе, общим объемом 1 мл, индуцируя острое воспаление толстого кишечника. Начиная со следующего дня, этим животным внутривенно вводили смесь антимикробных препаратов (амоксциллин, метронидазол и кларитромицин) в следующем режиме: 1 мл раствора антимикробных препаратов в суточной дозе по 15 мг каждого препарата на крысу в течение трех дней, что провоцировало антибиотик-индуцированный дисбиоз; 3) ССВО с введением смеси пробиотических лакто- и бифидобактерий (SIRS + LBS) – крысам с ССВО вместо 1 мл физиологического раствора в течение 8 дней вводили 1 мл раствора смеси пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) и *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12), в концентрации не менее 10^8 колониеобразующих единиц (КОЕ) каждого штамма на одно животное; 4) ССВО с введением сахаромисетов (SIRS + SB) – крысам данной группы в 1 мл физиологического

ческого раствора вводили 25 мг лиофилизированных *Saccharomyces boulardii* на одно животное; 5) ССВО с введением энтерококков (SIRS + EF) – крысам данной группы в качестве пробиотических микроорганизмов вводили лиофилизированные *Enterococcus faecium* L3 в дозе 10^8 КОЕ на одно животное. Краткие сведения об использованных штаммах приведены в обсуждении.

На 8-й день после моделирования ССВО, на 40 случайно отобранных крысах для соответствующих групп ($n = 8$), проводили опыт по методике окклюзии левой коронарной артерии под изофлурановым наркозом, которая включала в себя следующие этапы: индукция анестезии, трахеостомия, катетеризация сонной артерии, катетеризация бедренной вены, торакотомия, моделирование ишемически-реперфузионного повреждения миокарда, включающее период стабилизации исходных значений, ишемию (30 мин) и реперфузию (120 мин). В конце эксперимента анестезия углублялась с 2%-ного до 5%-ного раствора изофлурана, выполнялась реокклюзия коронарной артерии и вводилось 2.5 мл синего Эванса (2%-ный раствор). Через 10 с после выявления четкой границы между перфузируемым и ишемизированным отделом сердца его быстро вырезали, промывали в физиологическом растворе и разрезали на 5 поперечных фрагментов толщиной 1.5–2.0 мм. Планиметрическую оценку размера инфаркта проводили путем окраски срезов сердца 1%-ным раствором трифенилтетразолия хлорида при температуре 37°C в течение 15 мин. Определяли размер зоны риска и размер инфаркта, которые выражали в процентах от общей площади среза и от площади зоны риска соответственно и вычисляли средние значения для данного сердца по результатам анализа 5 срезов [11].

У оставшихся 40 крыс соответствующих групп под краткосрочным наркозом брали цельную кровь (2 мл) из большой подкожной вены для гематологического, биохимического и иммунологического анализа. Клинический анализ крови выполняли на автоматическом ветеринарном гематологическом анализаторе (URIT-3000 Vet Plus, URIT Medical Electronic, Китай). Концентрацию кальция (Ca^{2+}), желчных кислот (ЖК), щелочной фосфатазы (ЩФ), мочевой кислоты и мочевины оценивали с помощью биохимического анализатора (BioChem Analette, HTI, США). Уровень трансформирующего фактора роста- β (TGF- β), фактора некроза опухолей- α (TNF- α), провоспалительных цитокинов IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-8, липополисахарида (LPS), моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) оценивали иммуноферментным методом (MR-96A, Mindray, Китай).

Посмертно измерялась масса некоторых внутренних органов – слепой кишки как макроскопического показателя антибиотик-индуцированного дисбиоза, печени – полифункционального органа, вырабатывающего желчь, почек – основы мочевыделительной системы, и селезенки как самого большого лимфоидного органа. Массовый коэффициент органов как процентное отношение массы органа к массе тела [12] в данной модели вычисляли без массы слепой кишки в связи с кратным увеличением внутрипросветного содержимого, индуцированного дисбиозом в результате введения антибиотиков. На протяжении всего эксперимента, ежедневно с 9 до 10 утра проводили оценку потребления корма и воды, а также массы тела животных.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программного пакета STATISTICA 10.0. Статистический анализ дискретных значений проводился с использованием непараметрического Н-критерия Краскела–Уоллиса для обнаружения статистически значимых различий, с последующим апостериорным сравнением с использованием критерия Манна–Уитни. Для повторных измерений непрерывного типа, проверку гипотезы о равенстве средневыворочных величин в нескольких независимых выборках проводили методами дисперсионного анализа ANOVA с проведением post-hoc теста (Tukey HSD). В таблицах использованы медианные значения (Me) и значения для нижнего и верхнего квартиля (25%; 75%). Для построения графических изображений использовали средние зна-

Таблица 1. Массовые коэффициенты органов, критерий Краскела–Уоллиса, (Ме; 25%; 75%), $n = 8$

Группа	CTR	SIRS	SIRS + LBS	SIRS + SB	SIRS + EF
Слепая кишка	1.41# (1.39; 1.45)	5.92* (4.64; 6.90)	2.68# (2.66; 2.68)	3.29*, # (3.03; 3.32)	3.25*, # (3.20; 3.29)
Печень	3.00# (2.96; 3.08)	2.69* (2.68; 2.70)	2.78* (2.77; 2.79)	3.08# (3.01; 3.17)	2.53*, # (2.51; 2.57)
Селезенка	0.18# (0.175; 0.182)	0.14* (0.136; 0.145)	0.17# (0.170; 0.175)	0.2*, # (0.197; 0.212)	0.17# (0.165; 0.178)
Почки	0.52# (0.509; 0.527)	0.57* (0.574; 0.576)	0.53 (0.532; 544)	0.56 (0.535; 0.566)	0.52# (0.522; 0.531)

* – $p < 0.05$ по отношению к группе CTR, # – $p < 0.05$ по отношению к группе SIRS (U-критерий). CTR – контроль; SIRS – синдром системного воспалительного ответа; SIRS + LBS – ССВО и смесь LA-5 и BB-12; SIRS + SB – ССВО и *S. boulardii*; SIRS + EF – ССВО и *E. faecium* L3.

чения и стандартные отклонения (*SD*). Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Масса тела и внутренних органов

Масса тела крыс в группе CTR, начиная со дня моделирования ССВО до окончания опыта, в среднем увеличивалась на 1.5 ± 0.6 г/сутки, тогда как в группах SIRS, SIRS + LBS, SIRS + SB и SIRS + EF наблюдали уменьшение массы тела животных на 3.9 ± 0.4 ; 3.6 ± 1.4 ; 3.9 ± 1.1 и 2.3 ± 0.2 г/сутки соответственно ($p < 0.05$ в сравнении с группой CTR). Потребление воды животными за этот же период, из расчета на 100 г массы тела, в группе CTR составило 7.1 ± 0.6 мл/сутки, что значительно не отличалось от значений данного показателя в остальных группах (7.5 ± 0.5 ; 7.3 ± 1.3 ; 8.3 ± 0.8 и 6.3 ± 1.2 мл/сутки для групп SIRS, SIRS + LBS, SIRS + SB и SIRS + EF соответственно). Потребление корма в группах из расчета на 100 г массы тела в сутки, начиная с дня моделирования, для крыс из группы CTR составило 3.9 ± 0.2 ; SIRS – 1.5 ± 0.03 ; SIRS + LBS – 1.6 ± 0.1 ; SIRS + SB – 1.8 ± 0.1 ; и SIRS + EF – 1.6 ± 0.2 г/100 г/сутки, показывая сокращение в опытных группах в 1.9–2.5 раза ($p < 0.05$) по отношению к контролю (рис. 2а, б, в).

В группе SIRS произошло уменьшение массового коэффициента печени на 16% ($p < 0.05$), в группе SIRS + LBS на 10% ($p < 0.05$), SIRS + EF на 19% ($p < 0.05$) по отношению к группе CTR, тогда как в группе SIRS + SB этот показатель не отличался от такового в группе CTR. Для селезенки отмечено уменьшение массового коэффициента в группе SIRS на 12% ($p < 0.05$) по сравнению с группой CTR. В группе SIRS + SB массовый коэффициент селезенки был на 12% выше, чем в группе CTR. Значимое увеличение массового коэффициента почек на 12% наблюдали в группе SIRS (табл. 1).

Клинический анализ крови

Значимых изменений числа эритроцитов и их характеристик в опытных группах по отношению к контролю не произошло (табл. 2). В группах SIRS и SIRS + EF отмечено увеличение тромбоцитов на 25% ($p < 0.05$ в сравнении с группой CTR). Описание лейкограммы в данной работе ограничено возможностями использованного анализатора второго класса, в связи с чем сделан акцент на процентном соотношении основных фракций лейкоцитов: LYM, MID, GRAN. В группе SIRS пока-

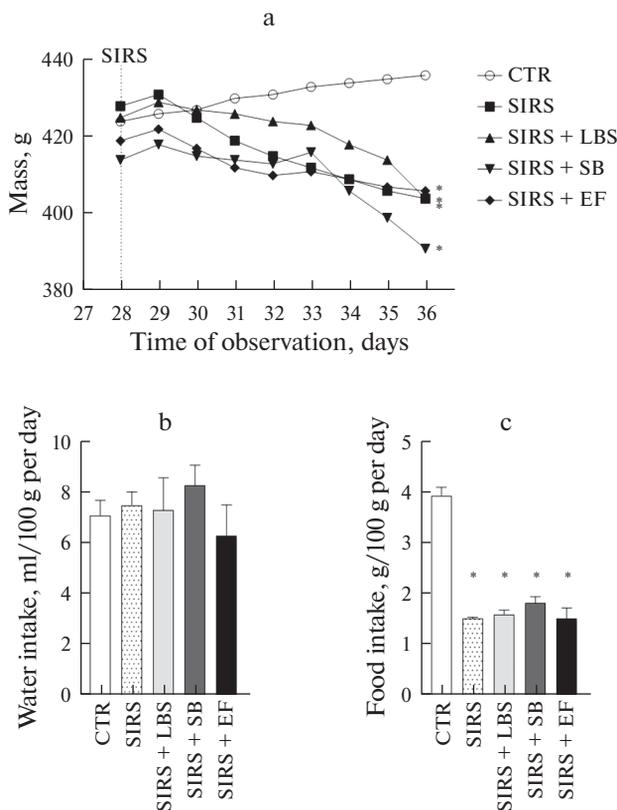


Рис. 2. Динамика изменения массы тела (а), потребление воды (б) и корма (с) со дня моделирования ССВО до окончания опыта, среднее значение ($\pm SD$).

CTR – контроль; SIRS – синдром системного воспалительного ответа; SIRS + LBS – ССВО и смесь LA-5 и BB-12; SIRS + SB – ССВО и *S. boulardii*; SIRS + EF – ССВО и *E. faecium* L3. * – $p < 0.05$ по отношению к группе CTR.

зано увеличение общего числа лейкоцитов на 13%, причем существенный вклад внесла популяция лимфоцитов (LYM) с увеличением на 45% ($p < 0.05$ в сравнении с группой CTR) с соответствующим относительным снижением представительства средних лейкоцитов MID и гранулоцитов на 23% ($p > 0.05$), хотя в абсолютном выражении их число, как и MID, также увеличилось. В группе SIRS + SB количество лейкоцитов уменьшилось на 32% по отношению к группе CTR и на 40% к группе SIRS ($p < 0.05$), а также произошло увеличение популяции MID на 45% ($p < 0.05$). В группах SIRS + LBS и SIRS + EF распределение числа исследованных фракций лейкоцитов по отношению к контролю существенно не отличалось, хотя в последней группе значимо уменьшилось количество MID на 45% ($p < 0.05$).

Биохимические параметры крови

Результаты анализа биохимических показателей крови представлены в табл. 3. В группе SIRS по сравнению с группой CTR отмечено значимое снижение уровня мочевины и желчных кислот ($p < 0.05$). При этом уровень мочевой кислоты, кальция, ЩФ и ЛДГ был, напротив, значимо выше в этой группе ($p < 0.05$ в сравнении

Таблица 2. Гематологические показатели, критерий Краскела–Уоллиса, Ме (25%; 75%), $n = 8$

Параметр	Группа				
	CTR	SIRS	SIRS + LBS	SIRS + SB	SIRS + EF
WBC, $10^9/л$	7.5 (6.7; 8.5)	8.5 (7; 11.3)	7.3 (5.8; 8.1)	5.1# (4.3; 6.2)	7.4 (6.4; 8.0)
LYM, %	27# (26; 35)	49* (40; 55)	35 (26; 51)	49* (43; 54)	36 (24; 44)
MID, %	9.5 (8.3; 11.4)	7.3 (6.5; 9.5)	8.2 (4.5; 8.9)	9.7 (9.1; 10.6)	5.2* (4.2; 9.3)
GRAN, %	61 (54; 68)	47 (40; 67)	58 (47; 65)	53 (44; 58)	58 (55; 65)
RBC, $10^{12}/л$	7.9 (7.6; 8.6)	7.6 (7.3; 7.9)	7.3 (6.9; 7.9)	8 (7.4; 8.4)	7.9 (7.8; 8)
PLT, $10^9/л$	657# (646; 767)	876* (860; 1010)	883 (812; 918)	735 (639; 849)	857* (731; 118)

* – $p < 0.05$ по отношению к группе CTR, # – $p < 0.05$ по отношению к группе SIRS. CTR – контроль; SIRS – синдром системного воспалительного ответа; SIRS + LBS – ССВО и смесь LA-5 и BB-12; SIRS + SB – ССВО и *S. boulardii*; SIRS + EF – ССВО и *E. faecium* L3. WBC – лейкоциты, LYM – лимфоциты, MID – популяция средних лейкоцитов, GRAN – гранулоциты, RBC – эритроциты, PLT – тромбоциты.

Таблица 3. Биохимические показатели крови, критерий Краскела–Уоллиса, Ме (25%; 75%), $n = 8$

Группа	CTR	SIRS	SIRS + LBS	SIRS + SB	SIRS + EF
Мочевина, мг/дл	25.1# (22.5; 25.4)	14.8* (12.2; 15.5)	14.2* (11.5; 17.2)	12.3* (10.3; 12.8)	21.2# (20.1; 25.3)
Мочевая кислота, мкмоль/л	19.8# (11.8; 27.8)	42.8* (28.8; 60.4)	40.6* (33.8; 45.1)	25.4# (21.9; 34.7)	32.1 (19.9; 35.5)
Кальций, ммоль/л	2.05# (0.95; 2.75)	3.10* (2.25; 3.5)	2.55 (1.40; 2.85)	2.35 (2.05; 2.65)	2.5 (2.20; 3.05)
Желчные кислоты, мкмоль/л	12.8# (11.3; 19.8)	3.7* (2.2; 6.1)	9.5*# (8.6; 11.6)	3.3* (2.4; 4.2)	4* (1.9; 6.8)
Щелочная фосфатаза, Ед/л	22.8# (18.2; 31.7)	36.3* (35.2; 37.8)	21.5# (14.6; 25.5)	21.3# (20; 28)	25# (19.9; 29.1)
Лактат дегидрогеназа, Ед/л	555# (486; 615)	835* (746; 852)	913* (909; 950)	396# (210; 421)	739 (389; 872)

* – $p < 0.05$ по отношению к группе CTR, # – $p < 0.05$ по отношению к группе SIRS. CTR – контроль; SIRS – синдром системного воспалительного ответа; SIRS + LBS – ССВО и смесь LA-5 и BB-12; SIRS + SB – ССВО и *S. boulardii*; SIRS + EF – ССВО и *E. faecium* L3.

с группой CTR). В группе SIRS + LBS значения уровня кальция, желчных кислот и ЩФ не отличались от группы CTR, т.е. происходила нормализация данных показателей. При этом сохранялись повышенная активность ЛДГ и повышенная концентрация мочевой кислоты, а также сниженный уровень мочевины, отмеченные в группе SIRS ($p < 0.05$). В группе SIRS + SB значения уровня мочевой кислоты, кальция и ЛДГ не отличались от группы CTR, но при этом сохранялись сниженный уровень мочевины и желчных кислот ($p < 0.05$). В группе SIRS + EF значения уровней мочевины, кальция, ЩФ и ЛДГ не отличались от таковых в группе CTR при сохраняющемся повышении концентрации мочевой кислоты и снижении уровня желчных кислот ($p < 0.05$). Таким образом, ССВО сопровождался существенными отклонениями всех оцениваемых биохимических параметров от нор-

Таблица 4. Иммунологические показатели крови, критерий Краскела–Уоллиса, Ме (25%; 75%), $n = 8$

Группа	CTR	SIRS	SIRS + LBS	SIRS + SB	SIRS + EF
IL-1 α , пг/мл	74# (66; 78)	100* (93; 109)	42*, # (31; 51)	48*, # (39; 50)	47*, # (45; 49)
IL-2, пг/мл	4.01# (3.15; 4.62)	6.01* (4.43; 6.54)	3.02# (2.90; 4.93)	3.80 (3.75; 4.24)	3.6# (3.12; 3.81)
IL-6, пг/мл	21# (19; 25)	48* (41; 64)	7.8*, # (7.6; 8.5)	5.4*, # (3.7; 7)	4.1*, # (3.3; 5.3)
IL-8, пг/мл	19# (18; 24)	57* (53; 66)	31# (30; 35)	67* (30; 93)	15# (14; 21)
MCP-1, пг/мл	4.87# (3.54; 5.68)	8.31* (7.26; 11.5)	4.11# (3.71; 4.68)	5.45# (4.09; 6.55)	6.91* (6.61; 8.22)
TNF- α , пг/мл	18# (17; 19)	25* (22; 26)	17# (16; 18)	17# (16; 18)	17# (16; 17)
TGF- β , пг/мл	4.35# (3.98; 4.59)	6.13* (5.63; 6.39)	6.76* (4.32; 7.78)	3.26# (3.05; 3.3)	4.93 (3.57; 4.93)
LPS, пг/мл	8.3# (7.9; 10)	71* (68; 75)	11.5# (10.7; 12.8)	50*, # (46; 54)	8.9# (8.0; 10.5)

* – $p < 0.05$ по отношению к группе CTR, # – $p < 0.05$ по отношению к группе SIRS. CTR – контроль; SIRS – синдром системного воспалительного ответа; SIRS + LBS – ССВО и смесь LA-5 и BB-12; SIRS + SB – ССВО и *S. boulardii*; SIRS + EF – ССВО и *E. faecium* L3.

мы, а применение различных режимов пробиотической коррекции приводило к частичной нормализации этих параметров, однако характер нормализации зависел от типа пробиотика.

Иммунологические показатели

Гиперпродукция всех иммунологических показателей крови, представленных в табл. 4, имела место в группе SIRS со значимым ($p < 0.05$) увеличением их концентрации в крови по сравнению с контролем. Увеличение показателей TNF- α на 28% и TGF- β на 29%, IL-1 α на 26%, IL-2 на 33%, MCP-1 на 41% в группе SIRS можно считать умеренными по сравнению с ростом IL-6 более чем в 2 раза, IL-8 в 3 раза и LPS почти в 10 раз ($p < 0.05$). В группе SIRS + LBS показано уменьшение концентрации IL-2, IL-8, MCP-1, TNF- α приблизительно до контрольных значений, что указывает на блокирование продукции плеiotропных цитокинов и метаболитов под влиянием пробиотической терапии, выраженное в стабилизации показателей воспалительного статуса. В группе SIRS + SB также отмечена нормализация уровней IL-2, MCP-1, TNF- α и TGF- β , а в группе SIRS + EF – всех кроме IL-1 α , IL-6 и MCP-1.

Размер инфаркта и гемодинамические показатели

Непараметрический анализ различий гемодинамических показателей программным пакетом для повторных измерений непрерывного типа (ANOVA) показал, что исходные показатели, данные для 5-й минуты ишемии, а также для 90-й и 120-й минуты реперфузии между группами не различались. В группе SIRS, начиная с 10-й минуты ишемии и до 60-й минуты реперфузии, уровень среднего артериального давления (САД) и частота сердечных сокращений (ЧСС) с начала ишемии и до 90-й минуты реперфузии, были значимо ниже по отношению к контролю ($p < 0.05$). В группе SIRS + SB в ходе всего наблюдения показатели ЧСС были зна-

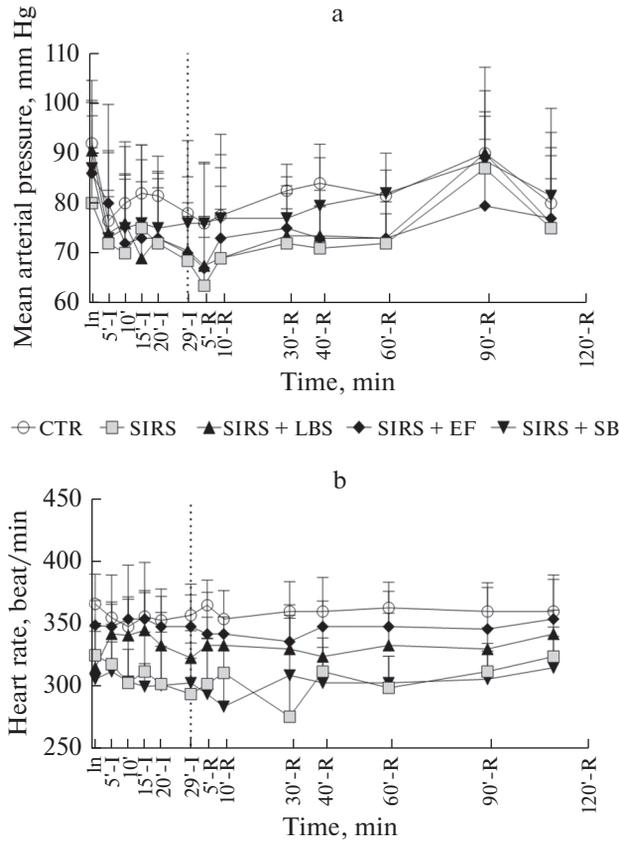


Рис. 3. Динамика изменения среднего артериального давления (а) и частоты сердечных сокращений (б) на протяжении ишемии и реперфузии, среднее значение ($\pm SD$).

CTR – контроль, SIRS – синдром системной воспалительной реакции, SIRS + LBS – CCBO и смесь LA-5 и BB-12, SIRS + SB – CCBO и *S. boulardii*, SIRS + EF – CCBO и *E. faecium* L3. Значимость в отдельных точках * – $p < 0.05$ по отношению к группе CTR указана в тексте.

чимо меньше, чем в группе CTR, а для САД были близкими к контрольным. В группе SIRS + LBS показатели САД были меньше контроля, начиная с 5-й до 40-й минуты реперфузии, при уменьшении ЧСС с 30-й минуты ишемии до 60-й минуты реперфузии, а в группе SIRS + EF САД уменьшилось с 10-й минуты ишемии до 40-й минуты реперфузии ($p < 0.05$), при ЧСС близкой к контролю (рис. 3а, б).

Медианные значения размера зоны риска от общей площади исследованной части миокарда составили 47% (39; 48), 45% (36; 48), 44% (38; 53), 43% (42; 50), 46% (40; 55) в группах CTR, SIRS, SIRS + LBS, SIRS + SB и SIRS + EF соответственно ($p > 0.05$), (рис. 2), что показывает равенство методических условий во всех экспериментальных группах. Размер инфаркта в группе CTR составил 42% (41; 46), а в группе SIRS – 55% (53; 59) от зоны риска, что значимо больше на 24%, тогда как в группе SIRS + LBS – 47% (41; 50) значение этого показателя было близким к контролю. В группах SIRS + SB и SIRS + EF размер инфаркта миокарда составил 59% (47; 61) и 58% (50; 59) соответственно, что больше чем в контроле на 40 и 38% ($p < 0.05$), и

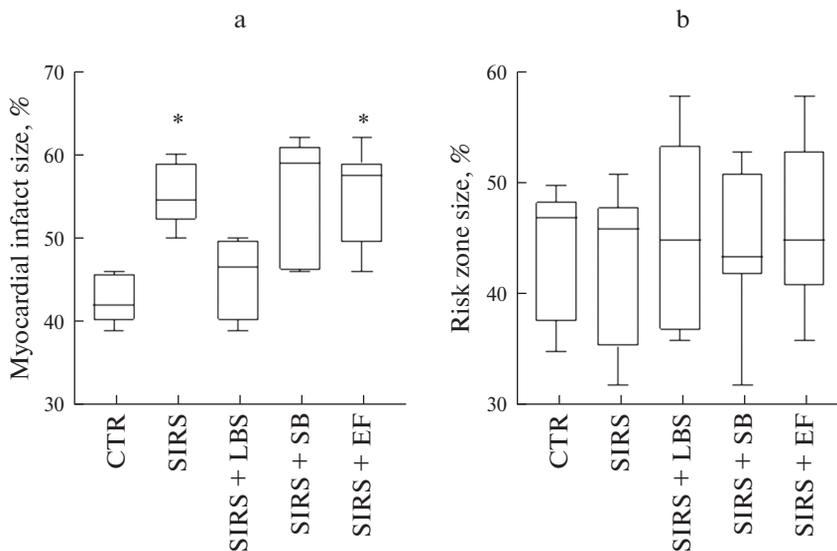


Рис. 4. Зона риска и зона некроза миокарда, Ме (25%; 75%).

CTR – контроль, SIRS – синдром системной воспалительной реакции, SIRS + LBS – ССВО и смесь LA-5 и BB-12, SIRS + SB – ССВО и *S. boulardii*, SIRS + EF – ССВО и *E. faecium* L3. * – $p < 0.05$ по отношению к группе CTR.

практически равно показателю в группе SIRS, это указывает на отсутствие кардиопротекции в этих группах, (рис. 4a, b).

Первичный анализ результатов позволяет заключить, что ССВО значительно увеличивает размер инфаркта на фоне существенного снижения САД и ЧСС, тогда как после пробиотической терапии в группе с введением лакто- и бифидобактерий этот показатель был близок к контролю, что говорит о возможной кардиопротекции в условиях ССВО. Для этой группы SIRS + LBS, после стабильности в период ишемии, показано снижение артериального давления в начале периода реперфузии с сопутствующим падением ЧСС по отношению к CTR, с последующим подъемом, что, видимо, носит компенсаторный характер. Введение других двух пробиотиков не отразилось на размере инфаркта после моделирования ССВО, несмотря на стабильность САД в группе SIRS + SB, и стабильность ЧСС в группе SIRS + EF, что показывает специфические особенности влияния различных пробиотических штаммов на координацию регуляторных механизмов функциональности миокарда. Все три пробиотика нормализовали, в той или иной степени, гематологические, биохимические, иммунологические и функциональные параметры, но только в группе SIRS + LBS помимо стабилизации большинства биохимических и иммунологических показателей, произошло уменьшение размера инфаркта до контрольных значений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе были исследованы кардиотропные эффекты трех пробиотических препаратов на модели регионарной ишемии–реперфузии миокарда у крыс с ССВО, включающим первичное висцеральное ожирение, антибиотик-индуцированный дисбиоз и острое воспаление толстого кишечника. Клинические исследо-

вания штаммов LA-5 и ВВ-12 показали благоприятное воздействие на микрофлору кишечника и местный иммунитет у здоровых людей и людей с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Под влиянием ВВ-12 происходит повышение продукции иммуноглобулина А в слизистой оболочке кишечника, что способствует повышению ее противоинфекционной резистентности [13, 14]. *Saccharomyces boulardii* проявляет антагонизм к ряду патогенных и условно патогенных микроорганизмов, подавляет их развитие; повышает местную иммунную защиту вследствие увеличения продукции иммуноглобулина А и других иммуноглобулинов, оказывает иммунобиологическое и антидиарейное действие [15]. Пробиотический штамм *Enterococcus faecium* L3 – непатогенный энтерококк, выделенный из молочной закваски с выраженным антагонизмом к патогенной и условно патогенной флоре с иммуномодулирующими и витаминообразующими свойствами [16, 17]. Максимальное увеличение массы слепой кишки в нашей работе было отмечено в группе SIRS при сравнении с группой СТР, что подтверждает антибиотик-индуцированное нарушение пищеварительной и эвакуаторной функций тонкой кишки [18, 19]. Общая картина изменений состава лейкоцитов, полученная в данном исследовании, в целом характерна для ожоговой травмы и сопровождается снижением числа гранулоцитов при увеличении представительства лимфоцитов и эозинофилов в группе SIRS [20]. В условиях моделирования ССВО на фоне увеличения основных субпопуляций лейкоцитов (LYM и MID) выявлены специфические особенности влияния пробиотических препаратов на изменения состава лейкоцитов. По отношению к группе SIRS интересно существенное снижение количества LYM и MID в группах SIRS + LBS и SIRS + EF, причем самое заметное уменьшение субпопуляции MID отмечено у крыс последней группы, что указывает на специфические особенности действия исследованных пробиотических препаратов.

Известно, что усиление лейкопоза возникает под влиянием таких провоспалительных цитокинов, как IL-1, IL-6, IL-8, а также под влиянием ряда медиаторов воспаления. Универсальными стимуляторами гранулоцитарно-моноцитарного лейкопоза являются гормоны адаптации – катехоламины и глюкокортикоиды, реализующие свои эффекты на костный мозг через усиление образования колоние-стимулирующих факторов и интерлейкинов. К числу стимуляторов лейкопоза относятся витамин В₁₂, аскорбиновая кислота, фолиевая кислота, железо. Подавление костномозгового кроветворения возможно под влиянием ряда медиаторов воспаления, таких как простагландины, IL-10, IL-13, TNF- α , TGF- β , а также лактоферрин и кислый изоферритин [21]. Однако анализ результатов экспериментального моделирования воспаления в нашем случае усложняется введением во внутреннюю среду организма с локальным химически индуцированным повреждением толстой кишки пробиотических штаммов, обладающих собственным про- и противовоспалительным потенциалом [22]. В нашей работе отмечено увеличение большинства провоспалительных цитокинов в группе с моделированием ССВО и снижение устойчивости миокарда к ИРП, тогда как в группе SIRS + LBS с размером инфаркта, не отличавшимся от контроля, отмечено уменьшение уровня провоспалительных цитокинов во всех исследованных случаях, а в группе SIRS + SB – отсутствие нормализации уровней LPS и IL-8, что может быть косвенно связано с отсутствием эффекта кардиопротекции. Однако нет оснований утверждать, что именно LPS или IL-8 является прямой причиной снижения устойчивости миокарда к ИРП, т.к. в группе SIRS + EF эффект кардиопротекции также не наблюдали при близости показателей этих маркеров к контрольным. Предпосылку к подобным рассуждениям дают сведения о возможной супрессии лейкопоза под действием TNF- α , TGF- β и др., как контур обратной регуляции при гипервозбуждении в системе воспаления. Можно предположить, что максимальный показатель TGF- β в группе SIRS + LBS объясняет сопряженное уменьшение комплекса меди-

аторов до близких к нормальным значениям, что способствует регуляции процессов лейкопоэза и гибели лейкоцитов, а также определенной стадийности дифференцировки элементов миелоидного, лимфоидного и мегакариоцитарного рядов с сохранением регуляторных механизмов устойчивости миокарда к ИПП.

Следует отметить, что показатели гемодинамики (АД и ЧСС) в группе SIRS были достоверно ниже параметров, регистрируемых в контроле, тогда как в группах SIRS + LBS и SIRS + EF ЧСС, а в группе SIRS + SB среднее АД за период наблюдения достоверно отличалась в сторону увеличения от группы SIRS.

К настоящему времени в литературе убедительно продемонстрировано, что уровень в крови провоспалительных цитокинов, и в частности TNF- α у пациентов с хронической сердечной недостаточностью ассоциирован с тяжестью клинических проявлений [23]. В связи с задачей исследования по выяснению кардиопротективной роли пробиотических микроорганизмов на фоне ССВО необходимо обратить внимание на изменения размера инфаркта миокарда в связи с концентрацией пула желчных кислот (ЖК) в крови животных. Остается открытым вопрос: являются ли ЖК маркером патологии энтерогапатической циркуляции или непосредственным участником патофизиологической цепочки “макроорганизм—ЖКТ—микробиота—воспаление—миокард”. Первичные ЖК образуются в печени, непосредственно участвуют в пищеварении и метаболизируются ферментами определенных представителей кишечной микробиоты, обладают прямым и косвенным антимикробным действием, выступают в роли эндогенных лигандов к рецепторам некоторых гормонов, регуляторных белков, витамина D₃ и др. Вторичные ЖК принимают участие в процессах ожирения, воспаления и канцерогенеза [24]. В патофизиологическом смысле являются интересными сведения о кишечном дисбиозе с воспалительными заболеваниями кишечника в связи с недостаточностью вторичных ЖК, немногими известными продуцентами которых являются представители семейств Lachnospiraceae и Ruminococcaceae, тогда как в процессе деконъюгации и гидролизе первичных ЖК участвуют многие кишечные комменсалы таких обширных родов, как *Bacteroides*, *Clostridium* и *Enterococcus* [25]. В наших предыдущих исследованиях на модели ССВО мы показали прямую корреляционную связь между увеличением площади некроза миокарда изолированного сердца и концентрацией в плазме крови уксусной и пропионовой кислоты, продуцентами которых являются факультативные и облигатные анаэробы, в т.ч. патогенные и условно-патогенные [7]. С другой стороны, продуцентами короткоцепочечных жирных кислот являются представители вышеупомянутых семейств Lachnospiraceae и Ruminococcaceae, что дает повод к неоднозначному и порой противоречивому толкованию роли и значения отдельных представителей микробиоты, часто рассматриваемых однозначными симбионтами [26]. Возвращаясь к результатам данного исследования о сочетанном снижении значений пула ЖК, ряда ключевых провоспалительных маркеров (TNF- α , IL-1, IL-8, MCP-1), нормализации лейкограммы и уменьшения площади некроза в группе SIRS + LBS после моделирования ССВО, можно предположить, что определенные представители кишечной микробиоты и пробиотические штаммы, а также их композиции в состоянии индуцировать как кардиопротективный ответ, так и напротив, снижать устойчивость миокарда к ИПП, что требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальная модель, включающая в себя первичное висцеральное ожирение, острое воспаление толстого кишечника и антибиотик-индуцированный дисбиоз, разработана для изучения потенциала пробиотических препаратов в отношении изучения возможности модуляции устойчивости миокарда к ише-

мии—реперфузии в условиях несбалансированного увеличения уровня цитокинов в крови. Данная модель отражает известную клиническую картину ССВО и требует комплексного изучения общих и специфических реакций организма на локальное и системное повреждение. В работе подтверждено, что ССВО сопровождается существенными отклонениями биохимических, гематологических и иммунологических показателей от нормы и приводит к увеличению размера инфаркта, т.е. снижает устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению. Показано, что все три использованных пробиотика в разной степени нормализуют возникающие при ССВО отклонения биохимических, гематологических и иммунологических показателей, при этом только смесь LA-5 и BB-12 приближает размер инфаркта к контрольному значению, т.е. обладает кардиопротективным потенциалом в условиях ССВО. Два остальных изученных пробиотика, несмотря на частичную нормализацию биохимических и иммунологических параметров на фоне ССВО, не обладают кардиопротективным действием. Главным выводом данной работы можно считать тот факт, что на экспериментальной модели ССВО различные пробиотические штаммы специфическим образом воздействуют на устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению. Полученные результаты могут быть использованы для исследования кардиопротективного потенциала пробиотических препаратов в рамках концепции трансляционной медицины.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00153).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Мы благодарим Зафара М. Шарифова за его отличную техническую помощь и неоценимый вклад в успешную реализацию проекта.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (Ю.Ю.Б., М.М.Г.), сбор данных (Ю.Ю.Б., Д.Л.С., И.Ю.Б., Ю.В.Ч., О.В.Б., М.М.Г.), обработка данных (Ю.Ю.Б., Д.Л.С., И.Ю.Б., В.Ю.Б.), написание и редактирование манускрипта (Ю.Ю.Б., И.Ю.Б., М.М.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Breton E, Fotso Soh J, Booij L* (2022) Immunoinflammatory processes: Overlapping mechanisms between obesity and eating disorders? *Neurosci Biobehav Rev* 138: 104688. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104688>
2. *Wise J* (2021) Covid-19: Highest death rates seen in countries with most overweight populations. *Br Med J* 372: n623. <https://doi.org/10.1136/bmj.n623>
3. *Bansal M* (2020) Cardiovascular disease and COVID-19. *Diabetes & Metabol Syndr* 14(3): 247–250. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.03.013>
4. *de Leeuw A, Oude Luttikhuis M, Wellen AC, Müller C, Calkhoven CF* (2021) Obesity and its impact on COVID-19. *J Mol Med (Berlin, Germany)* 99(7): 899–915. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02072-4>

5. Вахитов ТЯ, Ситкин СИ (2014) Концепция суперорганизма в биологии и медицине. Экспер клин гастроэнтерол 107 (7): 72–85. [Vakhitov TYa, Sitkin SI (2014) The superorganism concept in biology and medicine. Exp Clin Gastroenterol 107 (7): 72–85. (In Russ)].
6. Megur A, Daliri EB, Baltrikienė D, Burokas A (2022) Prebiotics as a tool for the prevention and treatment of obesity and diabetes: classification and ability to modulate the gut microbiota. Int J Mol Sci 23(11): 6097. <https://doi.org/10.3390/ijms23116097>
7. Борщев ЮЮ, Буровенко ИЮ, Карасева АБ, Минасян СМ, Борщев ВЮ, Семенова НЮ, Борщева ОВ, Половинкин ВВ, Родионов ГГ, Суворов АН, Галагудза ММ (2020) Моделирование синдрома системной воспалительной реакции химической индукцией травмы толстого кишечника у крыс. Мед иммунол 22(1): 87–98. [Borshev YuYu, Burovenko IYu, Karaseva AB, Minasyan SM, Borshev VYu, Semenova NYu, Borshcheva OV, Polovinkin VV, Rodionov GG, Suvorov AN, Galagudza MM (2020) Modeling of systemic inflammatory response syndrome by chemical induction of colon injury in rats. Med Immunol (Russia) 22(1): 87–98. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-MOS-1839>
8. Борщев ЮЮ, Минасян СМ, Буровенко ИЮ, Борщев ВЮ, Процак ЕС, Борщева ОВ, Галагудза ММ (2020) Влияние азитромицина на устойчивость миокарда к ишемии–реперфузии в условиях синдрома системной воспалительной реакции на фоне алиментарного ожирения. Бюл экспер биол мед 170 (11): 569–574. [Borshchev YuYu, Minasyan SM, Burovenko IYu, Borshcheva OV, Galagudza MM (2020) The effect of azithromycin on myocardial resistance to ischemia/reperfusion in the setting of systemic inflammatory response syndrome and alimentary obesity. Bull Exp Biol Med 170(11): 569–574. (In Russ)]. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2020-170-11-569-574>
9. Борщев ЮЮ, Буровенко ИЮ, Карасева АБ, Минасян СМ, Процак ЕС, Борщев ВЮ, Семенова НЮ, Борщева ОВ, Суворов АН, Галагудза ММ (2021) Влияние качественного состава высокожировой диеты на уровень цитокинов и устойчивость миокарда к ишемии–реперфузии у крыс с синдромом системного воспалительного ответа. Мед иммунол 23(5): 1089–1104. [Borshev YuYu, Burovenko IYu, Karaseva AB, Minasyan SM, Protsak ES, Borshev VYu, Semenova NYu, Borshcheva OV, Suvorov AN, Galagudza MM (2021) Effect of the qualitative composition of a high-fat diet in rats with systemic inflammatory response syndrome upon myocardial resistance to ischemic-reperfusion injury and cytokine levels. Med Immunol (Russia) 23(5): 1089–1104. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-EOT-2166>
10. Borshchev YY, Sinita AV, Zakharchenko MM, Borshchev VY, Burovenko IY, Galagudza MM (2019) Effect of antibiotic-induced dysbiosis and its correction with probiotics on myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in SPF rats. Bull Exp Biol Med 166(4): 440–443. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04368-5>
11. Sonin D, Papayan G, Pochkaeva E, Chifu S, Minasyan S, Kurapeev D, Vaage J, Petrishchev N, Galagudza M (2016) In vivo visualization and ex vivo quantification of experimental myocardial infarction by indocyanine green fluorescence imaging. Biomed Opt Express 8(1): 151–161. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.000151>
12. Луговик ИА, Макарова МН (2021) Токсикологические исследования. Референтные интервалы массовых коэффициентов внутренних органов на выборке, состоящей из 1000 аутбредных крыс. Лабор животные для научн исследов 1: 3–11. [Lugovik IA, Makarova MN (2021) Toxicological Studies. Reference intervals of mass coefficients of internal organs in a sample of 1000 rats. Labor Animals for Study 1: 3–11. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-01-01>
13. Ситкин СИ, Вахитов ТЯ, Демьянова ЕВ (2018) Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии. Альманах клин мед 46 (5): 396–425. [Sitkin SI, Vakhitov TY, Demyanova EV (2018) Microbiome, gut dysbiosis and inflammatory bowel disease: That moment when the function is more important than taxonomy. Almanac Clin Med 46(5): 396–425. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2018-46-5-396-425>
14. Zabadalashvili NG, Makhviladze MA, Diasamidze MT, Abdulashvili NN (2009) The comparative study of Linex and Lacto-G in treatment of adult patients with dysbacteriosis. Georgian Med News 170: 38–42. PMID: 19556637
15. Ардатская МД, Бельмер СВ, Добрица ВП, Захаренко СМ, Лазебник ЛБ, Минушкин ОН, Орешко ЛС, Ситкин СИ, Ткаченко ЕИ, Суворов АН, Хавкин АИ, Шендеров БА (2015) Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние и проблемы. Комплексная диагностика и лечебная коррекция. Экспер клин гастроэнтерол 5 (117): 13–50. [Ardatskaya MD, Belmer SV, Dobrica VP, Zakharenko SM, Lazebnik LB, Minushkin ON, Oreshko LS, Sitkin SI,

- Tkachenko EI, Suvorov AN, Khavkin AI, Shenderov BA* (2015) Dysbiosis (dysbacteriosis) of the intestine: current state of the problem. Comprehensive diagnostics and therapeutic correction. *Exp Clin Gastroenterol* 5 (117): 13–50. (In Russ)].
16. *Суворов АН* (2010) Клинические и профилактические возможности использования пробиотиков на основе *Enterococcus faecium* L3. Санкт–Петербург – Гастро–2010: материалы XII Междунар Славяно–Балт науч конгр СПб. М85. [*Suvorov AN* (2010) Clinical and prophylactic possibilities of using probiotics based on *Enterococcus faecium* L3. St. Petersburg – Gastro–2010: Materials of the XII Int Slavic–Baltic Scientific Congr SPb. M85. (In Russ)].
 17. *Бондаренко ВМ, Суворов АН* (2008) Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции. *Журн микробиол эпидемиол иммунобиол* 3: 14. [*Bondarenko VM, Suvorov AN* (2008) Symbiotic enterococci and problems of enterococcal opportunistic infection. *J Microbiol Epidemiol Immunobiol* 3: 14. (In Russ)].
 18. *Борщев ЮЮ, Громова ЛВ, Ермоленко ЕИ, Грефнер НМ, Борщева ИЮ, Груздков АА* (2012) Реакция пептидгидролаз тонкой и толстой кишки крыс на введение антибиотиков. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 98(6): 724–733. [*Borshchev YuYu, Gromova LV, Ermolenko EI, Grefner NM, Borshcheva IYu, Gruzdkov AA* (2012) Reaktsiya peptidgidrolaz tonkoy i tolstoy kishki kryс na vvedeniye antibiotikov. *Russ J Physiol* 98(6): 724–733. (In Russ)].
 19. *Буровенко ИЮ, Борщев ЮЮ, Минасян СМ, Процак ЕС, Шептицкий ВА, Галагудза ММ* (2019) Исследование всасывания моносахаридов в изолированной петле тонкой кишки и устойчивости миокарда к ишемии–реперфузии у крыс при введении антимикробных препаратов. *Экспер клин гастроэнтерол* 3(163): 43–50. [*Burovenko IYu, Borshchev YuYu, Minasian SM, Protsak ES, Sheptitskii VA, Galagudza MM* (2019) The study of absorption of monosaccharides in the isolated intestine and resistance of the myocardium to ischemia–reperfusion in rats after administration of antimicrobial agents. *Exp Clin Gastroenterol* (3): 43–50. (In Russ)].
 20. *Ажикова АК, Журавлева ГФ* (2016) Исследование гематологических показателей крыс в норме и в условиях термического воздействия. *Совр пробл науки образов* 2: 284. [*Azhikova AK, Zhuravleva GF* (2016) Research of hematologic indicators of rats is normal and in the conditions of thermal influence. *Modern Probl Sci Educat* 2: 284. (In Russ)].
 21. *Чеснокова НП, Понукалина ЕВ, Полутова НВ, Бизенкова МН, Жевак ТН, Моррисон ВВ* (2015) Лекция 1. Лейкоциты крови: общая характеристика, классификация, лейкопоэз и его регуляция. *Междунар журн прикладн фундамент исследован* 4(2): 280–284. [*Chesnokova NP, Ponukalina YEY, Polutova NV, Bizenkova MN, Zhevak TN, Morrison VV* (2015) Lession 1. Blood leukocytes: general characteristics, classification, leukopoiesis and its regulation. *Int J Appl Found Investig* 4(2): 280–284. (In Russ)].
 22. *Аверина ОВ, Ермоленко ЕИ, Ратушный АЮ, Тарасова ЕА, Борщев ЮЮ, Леонтьева ГФ, Крамская ТА, Котылева МП, Даниленко ВН, Суворов АН* (2015) Влияние пробиотиков на продукцию цитокинов в системах *in vitro* и *in vivo*. *Мед иммунол* 17(5): 443–454. [*Averina OV, Ermolenko EI, Ratushniy AYU, Tarasova EA, Borschev YuYu, Leontieva GF, Kramskaya TA, Kotyleva MP, Danilenko VN, Suvorov AN* (2015) Influence of probiotics on cytokine production in the *in vitro* and *in vivo* systems. *Med Immunol (Russia)* 17(5): 443–454. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-443-454>
 23. *Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL* (1998) Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 97(14): 1382–1391.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.97.14.1382>
 24. *Jia W, Xie G, Jia W* (2018) Bile acid–microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15(2): 111–128.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.119>
 25. *Sinha SR, Haileselassie Y, Nguyen LP, Tropini C, Wang M, Becker LS, Sim D, Jarr K, Spear ET, Singh G, Namkoong H, Bittinger K, Fischbach MA, Sonnenburg JL, Habtezion A* (2020) Dysbiosis–induced secondary bile acid deficiency promotes intestinal inflammation. *Cell Host Microbe* 27(4): 659–670.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.021>
 26. *Vacca M, Celano G, Calabrese FM, Portincasa P, Gobbetti M, De Angelis M* (2020) The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* 8(4): 573.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573>

**The Effect of Probiotic Strains on Myocardial Infarction Size,
Biochemical and Immunological Parameters in Rats
with Systemic Inflammatory Response Syndrome and Polymorbidity**

**Yu. Yu. Borshchev^a, D. L. Sonin^{a, b}, I. Yu. Burovenko^a, V. Yu. Borshchev^b,
Yu. V. Cheburkin^a, O. V. Borshcheva^a, and M. M. Galagudza^{a, b, *}**

^a*Almazov National Medical Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Saint-Petersburg, Russia*

^b*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia*

**e-mail: galagudza@almazovcentre.ru*

Numerous experimental and clinical studies have shown the effectiveness of various probiotic strains in metabolic disorders, gastrointestinal and liver diseases, immune system pathology. The effects of probiotics on cardiovascular dysfunction are less well known. The development and validation of a new experimental model in rats, including obesity, acute colon inflammation and antibiotic-induced dysbiosis, with common characteristics of systemic inflammatory response syndrome (SIRS), became the basis for investigating the effects of probiotic drugs on myocardial resistance to ischemic-reperfusion injury (IRI) using an in vivo model of infarction after coronary occlusion. A 24% increase in myocardial infarction compared to intact animals ($p < 0.05$) and significant changes in leukogram, biochemical and immunological parameters were found in Wistar rats with SIRS modelling. Introduction of a mixture of strains of *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) to animals with SIRS reduced infarct size to a value close to the control. Rats treated with LA-5 and BB-12 also showed normalization of the leukocyte count, bile acids, transforming growth factor- β , interleukins: IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-8, tumor necrosis factor- α , lipopolysaccharide and monocyte chemoattractant protein-1 in blood in comparison with the SIRS group and with the groups treated with other probiotic strains. The obtained data convincingly show the prospects for further study of the cardiotropic potential of probiotic microorganisms in translational studies.

Keywords: heart, ischemia, reperfusion, infarct size, polymorbidity, systemic inflammatory response syndrome, cytokines, probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИННЕРВАЦИИ
ЭПИКАРДИАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫСЫ В РАННЕМ
ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

© 2022 г. Е. И. Чумасов^{1, 2, *}, Е. С. Петрова¹, Д. Э. Коржевский¹

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

²*Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины,
Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: iemtmorphol@yandex.ru*

Поступила в редакцию 08.10.2022 г.

После доработки 04.11.2022 г.

Принята к публикации 05.11.2022 г.

Цель исследования – изучение строения и иннервации эпикардиальной жировой ткани (ЭЖТ) аортально-пульмональной области сердца крысы на ранних стадиях развития и половозрелого возраста (1, 14 сут, 3–4 мес.). В работе использовали гистологические методы (окраска гематоксилином-эозином и толуидиновым синим), а также иммуногистохимические методы для выявления нервных структур (белка PGP 9.5, тирозингидроксилазы, синаптофизина). Изучен гистогенез и дифференцировка адипоцитов ЭЖТ. Установлено, что презумптивные закладки “жировых подушек” из бурой и белой жировой ткани сердца образуются из “эпителиальных телец”, расположенных в основании магистральных сосудов аортально-пульмональной области новорожденной крысы. По мнению авторов, именно эпителиоморфная ткань является камбиальной, служит источником для стволовых клеток жировой ткани. Белая жировая ткань, представленная кольцевидными адипоцитами, является ее производной, ответственной за синтез и накопление триглицеридов, составляющей основную часть жирового депо органа. Показано, что гистогенез обоих типов жировой ткани с первого дня рождения сопровождается васкулогенезом. Одновременно в жировой ткани формируются терминальные сплетения из катехоламинергических и холинергических варикозных аксонов, представляющие собой дистантные синаптические аппараты en passant. Установлена следующая закономерность: на ранних стадиях (P1–P14), в период дифференцировки жировых клеток, в ЭЖТ преобладают катехоламинергические постганглионарные симпатические терминальные аксоны. И наоборот, у половозрелых (3–4 мес.) животных отмечено выраженное снижение катехоламинергических и преобладание холинергических нервных волокон.

Ключевые слова: эпикардиальная жировая ткань крысы, онтогенез, иннервация, белок PGP 9.5, тирозингидроксилаза, синаптофизин, иммуногистохимия

DOI: 10.31857/S0869813922120032

Актуальность исследования жировой ткани объясняется недостатком знаний об этиологии и патогенезе ожирения, одной из современных проблем нарушения метаболизма. Несмотря на то, что морфофункциональные особенности жировой ткани изучаются в течение многих лет, и результаты этих исследований обобщены в руководствах, монографиях и обзорных статьях [1–3], до сих пор неизвестны причины возникновения ожирения, механизмы развития жировой ткани, неясна роль

нервной системы в процессе развития ожирения. Особый интерес жировая ткань представляет для современной регенеративной медицины, являясь одним из источников получения мезенхимных стволовых клеток. В связи с этим в настоящее время жировая ткань широко исследуется [4, 5].

В последние годы появляются работы, касающиеся нейротрофики жировой ткани, нейрогуморальной регуляции липидного обмена, органоспецифического значения жировой ткани, классификации и морфофункциональных особенностей адипоцитов, их развития и дифференцировки в фило- и онтогенезе. На основании топографических, морфологических и функциональных различий и организации тканевого и клеточного состава жировую ткань подразделяют на два подвида – белую и бурую (white adipose tissue and brown adipose tissue), а некоторые авторы выделяют промежуточную группу – “бежевых” адипоцитов (beige adipose tissue) [6–9].

Существует мнение, что человек рождается на свет с определенным количеством адипоцитов и клеток, способных при необходимости превратиться в них из преадипоцитов [3, 7]. С такими патологиями как ожирение, метаболический синдром, атеросклероз и сахарный диабет 2-го типа тесно связано развитие сердечно-сосудистых заболеваний. К факторам риска перечисленных заболеваний кроме ожирения можно отнести изменения в депо жировой ткани, локализованной в основании сердца, известной как эпикардальная жировая ткань (ЭЖТ) [3, 10–12]. В околосердечной области определяют послойность расположения жировой ткани: снаружи находится перикардальный слой, который может составлять до 40%, под ним – эпикардальный слой, который по сути врастает в миокард без каких-либо четких границ [3]. В последнее время число экспериментальных и клинических наблюдений, доказывающих физиологическую и метаболическую значимость эпикардальной жировой ткани, растет. ЭЖТ отличается от других жировых депо организма. Установлена экспрессия клетками жировой ткани различных цитокинов: нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), интерлейкинов (IL-1, IL-6, IL-17), моноцитарного хемоаттрактант-белка (MCP-1), оментина, фактора некроза опухоли альфа (TNF α) [13]. Несмотря на активно разрабатываемые концептуально-теоретические и клинические аспекты проблемы, касающейся жировой ткани, наименее изученными остаются вопросы о строении, функциях, особенностях иннервации белой и бурой жировой тканью разных отделов организма. Большой интерес представляют вопросы нервной, иммунной и гормональной регуляции жировой ткани. Исследования жировых подушек подкожной жировой ткани и многих висцеральных органов (межлопаточной, периренальной, паховой и овариальной областей) продемонстрировали присутствие в них иммунореактивных нервных волокон к субстанции P, нейропептиду-Y (NPY), кальцитонин-ген-связанному пептиду (CGRP), тирозингидроксилазе, расположенных вокруг питающих артерий и в сопровождающих их нервных пучках [14, 15]. Следует отметить, что по сравнению с другими типами тканей вопросы эволюции и онтогенеза ЭЖТ животных и человека мало изучены. Требуется углубленных исследований нервной регуляции липидного обмена на разных этапах онтогенеза, а также участие иннервации в гистогенетических процессах развивающихся в жировой ткани.

Цель настоящего исследования – изучение строения и иннервации ЭЖТ аортально-пульмональной области сердца крысы на разных этапах постнатального развития с применением нейроиммуногистохимических маркеров.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили фрагменты жировой ткани околосердечной области крыс Вистар разного возраста: 1, 14 сут, 3–4 мес. ($n = 20$). При работе с животными соблюдали международные правила Европейского сообщества по гуман-

ному обращению с экспериментальными животными. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 2/22 от 06.04.2022). Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида в течение одних суток [16] и после обезживания в спиртах возрастающей концентрации и ксилоле заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Pfm Rotary 3003 (PFM, Германия). На срезах проводили иммуногистохимические реакции для выявления трех нейральных маркеров. Ферментный маркер – белок тирозингидроксилазу (ТН) – использовали для идентификации катехоламинергических структур симпатической нервной системы. Белок PGP 9.5 применяли для выявления всех нервных аппаратов без учета их медиаторной принадлежности [17]. Для исследования тонких терминальных окончаний применяли синаптофизин (Syn) [18]. Для выявления белка PGP 9.5 использовали поликлональные кроличьи антитела в разведении 1 : 200 (Spring Bioscience, США); для выявления Syn применяли поликлональные кроличьи антитела в разведении производителя (MONOSAN, Нидерланды); для ТН – поликлональные кроличьи антитела в разведении 1 : 1000 (Abcam, Великобритания). Первичные антитела в нужном разведении наносили на гистологические срезы после депарафинирования на 1 сут. В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Reveal Polyvalent HRP/DAB Detection System kit (SpringBioscience, США). Негативный контроль для иммуногистохимических реакций проводили путем нанесения на срезы вместо первичных антител их разбавителя (Dako, Дания). Часть срезов окрашивали толуидиновым синим и гематоксилином-эозином. Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологический анализ сердца новорожденных крыс (P1) показал, что ЭЖТ еще не сформирована и отсутствует. В области расположения корней магистральных артериальных и венозных сосудов сердца и бронхов располагаются округлой формы “эпителиальные тельца” размерами 150–200 мкм в диаметре. Они тесно прилегают к стенкам перечисленных магистральных кровеносных сосудов и воздухоносных путей и по строению сходны с железистой тканью (рис. 1а). Тельце состоит из глобул, в состав которых входят 4–8 клеток округлой, овальной или полигональной формы. Клетки имеют центрально расположенное гиперхромное ядро с одним–двумя ядрышками и большой объем цитоплазмы, заполненной микровезикулярными органеллами, которые наиболее четко выявляются на препаратах, окрашенных толуидиновым синим (рис. 1б). Анализ материала показал, что именно из клеток этих телец в постнатальном онтогенезе развиваются презумптивные элементы: преадипоциты и зрелые адипоциты белой и бурой жировых тканей. Вокруг телец и внутри, между глобулами, видны тонкие прослойки слабо развитой интерстициальной ткани. Сосуды в тельцах, как правило, не выявляются.

Вблизи телец видны ганглии, нервные стволы, а внутри – сплетения из пучков немиелинизированных нервных волокон (рис. 1а, б).

Имуногистохимическое исследование с применением антител к белку PGP 9.5 показало, что на серийных срезах ЭЖТ крыс ранних сроков постнатального развития (P1–P14) вокруг и внутри эпителиальных телец, соседних органов (сосудов, бронхов, пучков миокардиоцитов) постоянно встречаются PGP 9.5⁺ и ТН⁺ фрагменты нервных стволиков, пучков и сплетений, а также PGP 9.5⁺ микроганглии и группы хромаффинных клеток. Особенно бросается в глаза обилие катехоламинергических структур в паренхиме самих телец. Так, ТН⁺ пучки симпатических нервных волокон и их тончайшие терминалы варикозных аксонов прослеживаются

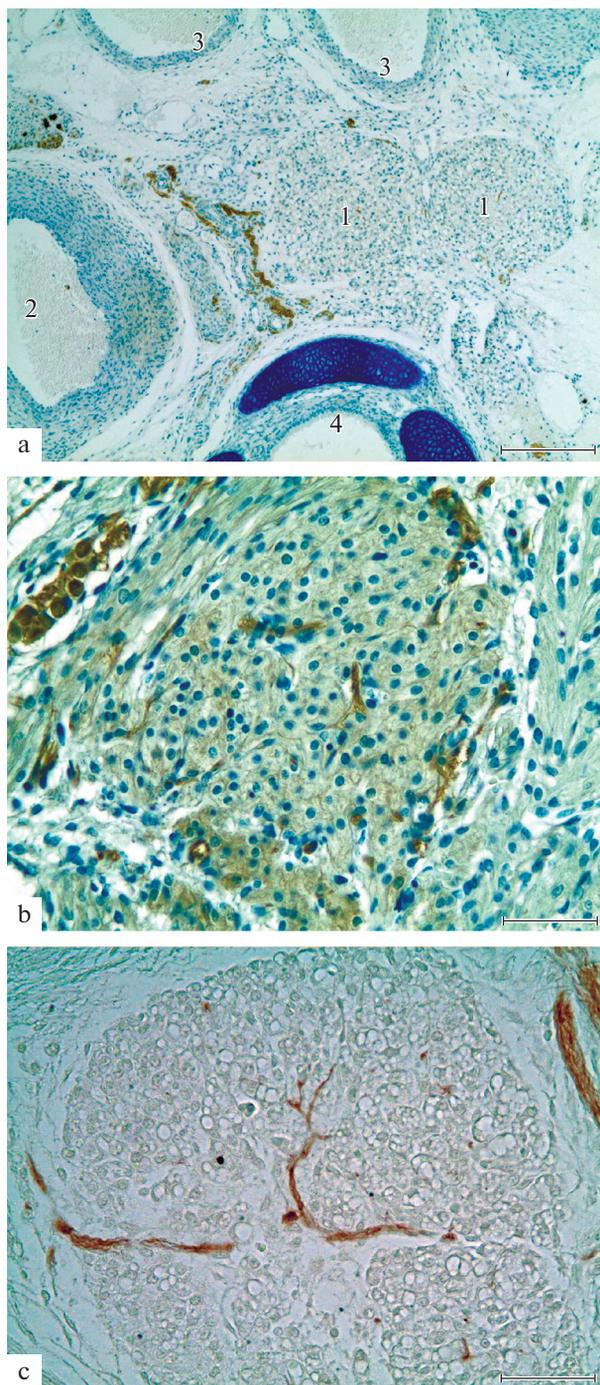


Рис. 1. Эпителиальные тельца новорожденной крысы в аортально-пульмональной области сердца. а – общий вид, б – строение тельца; с – нервное сплетение в тельце. 1 – эпителиальное тельце; 2 – артерия; 3 – вена; 4 – трахея. Иммуногистохимическая реакция на белок PGP 9.5 (а, б) и тирозингидроксилазу (с), докраска толуидиновым синим (а, б). Масштабный отрезок равен 200 мкм (а), 50 мкм (б, с).

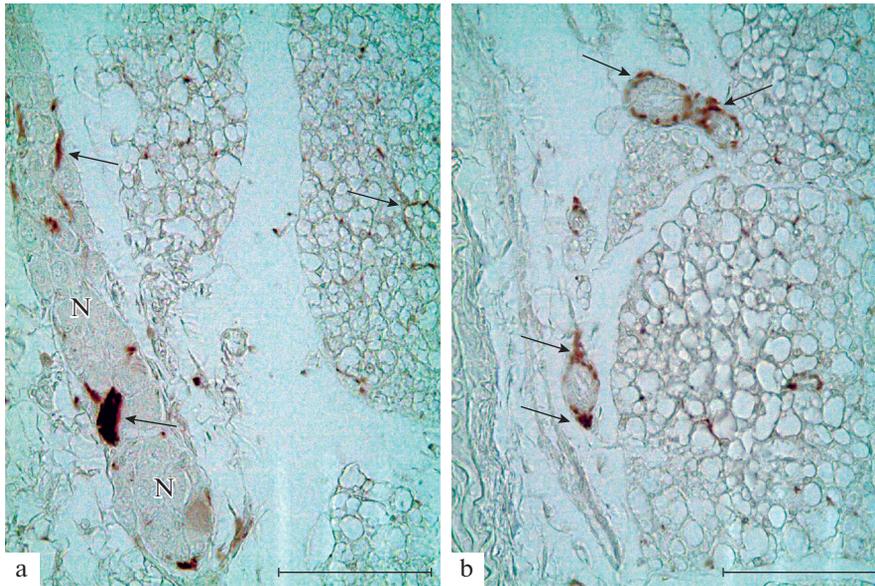


Рис. 2. Тирозингидроксилаза-иммунопозитивные нервные структуры в парасимпатическом ганглии (а) и терминальные варикозные аксоны вокруг сосудов (б) в жировой ткани смешанного типа у крыс в возрасте 14 сут. N – нервные клетки в ганглии; фрагменты нервных пучков (стрелки). Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

между глобулами и их клетками (рис. 1с). В некоторых тельцах выявляются клетки с признаками преадипоцитов и адипоцитов. Трансформация клеток телец в адипоциты сопровождается изменением их формы, размеров, увеличением их числа, повышенной активностью, сопровождающейся формированием в цитоплазме везикулярных структур и различных размеров липидных вакуолей. В процессе дифференцировки из эпителиальных предшественников образуются две популяции жировых клеток: белые и бурые адипоциты, формируется белая и бурая жировая ткань.

Использование гистологических и иммуногистохимических методов исследования показало, что на 10–14-е сутки постнатального развития в формирующейся жировой ткани выявляются уже артериальные кровеносные сосуды: крупные, средние и мелкие артерии, артериолы и капилляры. Они окружены непрерывной плотной сетью терминальных тяжей варикозных аксонов, представляющих собой систему дистантных синапсов типа *en passant*. Сравнительный иммуногистохимический анализ показал, что в тончайших тяжах этого сплетения проходят как PGP 9.5⁺, так и TH⁺ аксоны. В этот срок хорошо прослеживаются взаимоотношения нервных структур (ганглиев, пучков нервных волокон и терминальных сплетений) с питающими сосудами и клетками ЭЖТ. Иногда встречаются отдельные ганглиозные клеточные тяжи, следующие на значительном протяжении среди долек дифференцирующейся жировой ткани. При этом видно, как во многих участках нейроны ганглии вплотную прилегают к разным типам жировых клеток – к бурым и белым адипоцитам (рис. 2а). По мере созревания ЭЖТ увеличивается число артериальных и венозных сосудов, возрастает плотность иннервации ткани (рис. 2б).

Морфологический анализ области основания сердца крысы в 3–4-месячном возрасте показал, что наиболее выраженная масса жировой ткани в сердце крысы сосредоточена в эпиперикардиальной области органа в виде трех “подушек”, лока-

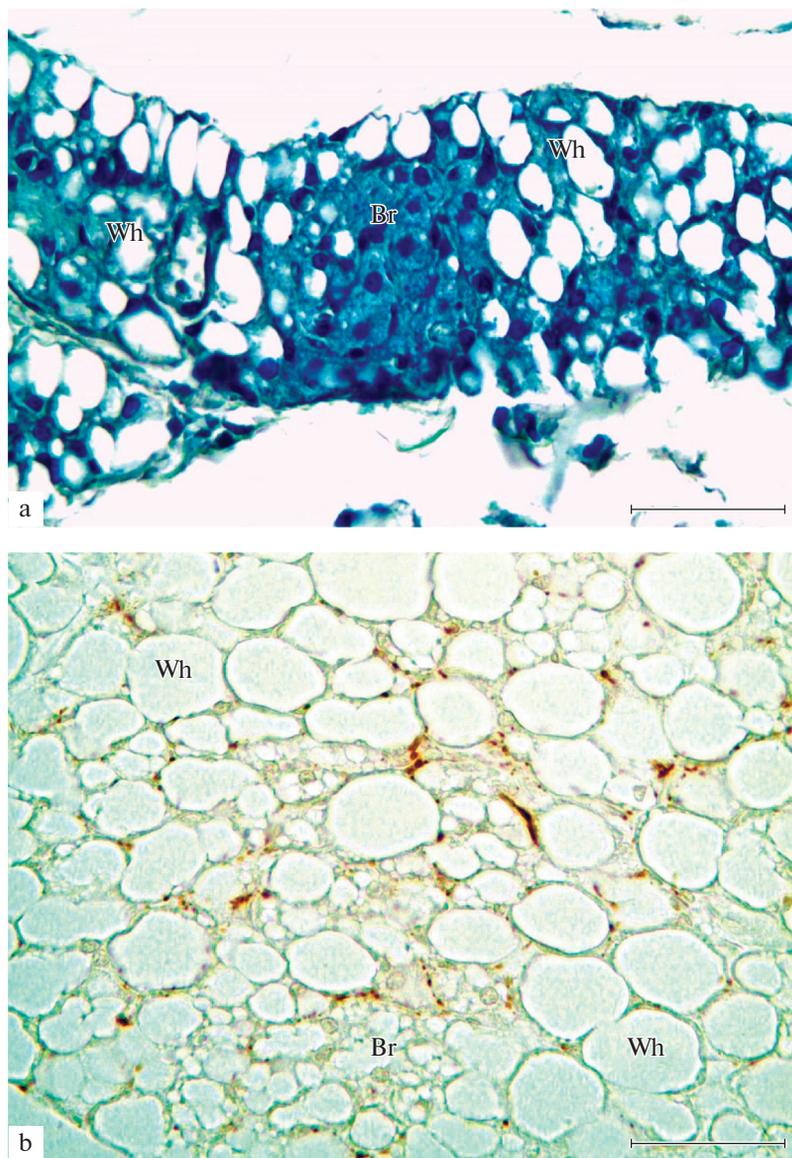


Рис. 3. Фрагменты жировой ткани околосердечной области крысы в возрасте 3–4-х месяцев. а – белая и бурая жировая ткань; б – плотная терминальная сеть варикозных аксонов в смешанной жировой ткани. Br – бурая жировая ткань; Wh – белая жировая ткань. Окраска толуидиновым синим (а); иммуногистохимическая реакция на белок PGP 9.6 (б). Масштабный отрезок равен 50 мкм.

лизующихся между магистральными сосудами: одна – между краниальной полой веной и аортой, вторая – между аортальным и легочным стволами, третья – на дорсальной стенке, в области впадения легочных вен в правое предсердие. У половозрелых крыс подушки ЭЖТ состоят из долек различного размера, в которых различается два вида тканей, состоящих из белых и бурых адипоцитов (рис. 3а, 4а). Адипоциты белой жировой ткани имеют крупные размеры, достигают в диаметре

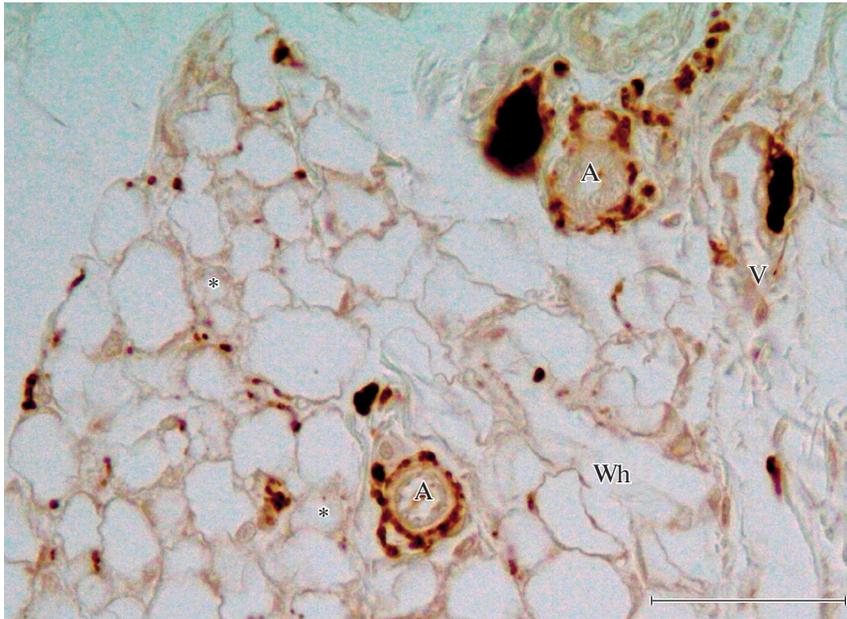


Рис. 4. Периваскулярные терминальные нервные сплетения и межклеточные окончания варикозных аксонов в смешанной ЭЖТ.

A – артериола; V – венула; Wh – белая жировая ткань; * – бурые адипоциты. Иммуногистохимическая реакция на PGP 9.5. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

50–75 мкм, практически весь объем этих клеток занимает липидная вакуоль, ядро смещено на периферию и имеет уплощенную форму. Белая жировая ткань в дольках, как правило, у взрослых крыс преобладает. В большинстве долек среди белой ткани постоянно встречаются скопления бурых адипоцитов. Бурые адипоциты – клетки округлой или кубической формы. Они легко отличаются по строению от белых адипоцитов и очень сходны по морфологии с клетками эпителиальных тел, мельче (15–20 мкм) адипоцитов белой жировой ткани, имеют сферической формы, центрально расположенное гиперхромное ядро с одним-двумя ядрышками и темноватую цитоплазму, в которой видны многочисленные микровезикулярные структуры. Среди них можно выделить клетки, находящиеся на различных стадиях дифференцировки: малодифференцированные преадипоциты, дифференцирующиеся и зрелые (белые и бурые) адипоциты. Между белыми и бурыми элементами встречаются также клетки переходной формы. Для них характерно наличие в цитоплазме кроме микровезикулярных структур также средних и относительно крупных размеров липидных вакуолей. ЭЖТ крыс в возрасте 3–4-х мес. богато васкуляризирована. В ее дольках видны артерии различного диаметра, артериолы и капилляры.

Применение иммуногистохимических маркеров показало, что ЭЖТ взрослых крыс хорошо иннервирована. В ее дольках можно видеть парасимпатические ганглии, группы хромаффинных клеток, синтезирующих катехоламины, нервные пучки и нервные сплетения из симпатических и парасимпатических безмиелиновых нервных волокон.

Входящие в дольки ЭЖТ артерии окружены PGP 9.5⁺ периваскулярной сетью из терминальных варикозных аксонов. Последние, по нашему мнению, представляют собой основную сеть дистантных синапсов типа *en passant*. Варикозные аксоны

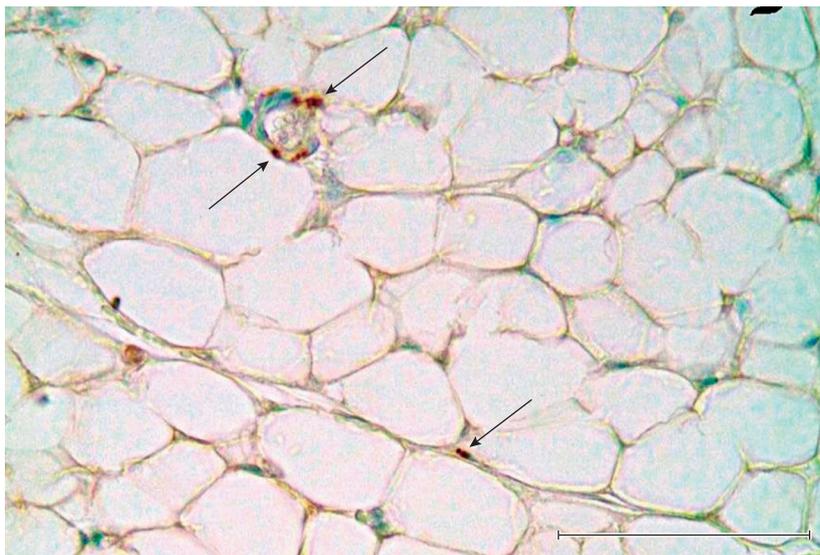


Рис. 5. Низкая степень иннервации белой жировой ткани; видны единичные поперечно срезанные тонкие пучки TH^+ аксонов в адвентиции редких сосудов (стрелки). Иммуногистохимическая реакция на тирозингидроксилазу. Масштабный отрезок равен 50 мкм.

этой сети наблюдаются не только вокруг гладкомышечных клеток артериальных сосудов, но часто вокруг адипоцитов бурой и смешанной ЭЖТ (рис. 3b, 4).

Установлено, что в бурой и белой жировой ткани находятся терминальные нервные сплетения из проводников разной медиаторной природы: TH^+ симпатических и PGR 9.5^+ парасимпатических нервных волокон. Наиболее выраженная иннервация выявлена в бурой и смешанной ЭЖТ, в то время как в белой жировой ткани иннервация выражена очень слабо (рис. 5). На поперечных срезах среди массы белых адипоцитов можно встретить лишь единичные пучки и тяжи нервных волокон, располагающихся в адвентиции артерий и артериол. С помощью реакции на синаптофизин удалось выявить тончайшие Syn^+ синаптические нервные окончания в составе периваскулярной сети, связанной с гладкомышечными клетками артериальной стенки сосудов, а также в виде свободно располагающихся между клетками белой и бурой ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние два десятилетия большое внимание исследователей уделяется вопросам происхождения, морфологии и иннервации белой и бурой жировой ткани. Выяснению этих вопросов посвящен ряд обзорных статей [3, 5, 8] и монография Афанасьева и Колодезниковой [1]. С помощью иммуногистохимической реакции установлено, что при экспериментальном снижении температуры окружающей среды в бурой жировой ткани увеличивается плотность иммунореактивных нервных сплетений TH^+ , CGRP^+ , VIP^+ нервных волокон [6], что более иннервированной является бурая жировая ткань [19]. Эти факты связывают с тем, что преадипоциты и адипоциты бурого жира ЭЖТ выполняют гормональную функцию – вырабатывают адипокины, влияющие на функционирование сердца [3]. Следует отметить,

что сердце в свою очередь через паракринную сигнализацию секреторных миокардиоцитов правого предсердия оказывает влияние на ЭЖТ [3].

В нашем исследовании показано, что ЭЖТ хорошо васкуляризирована и иннервирована. У новорожденных, 14-суточных и взрослых половозрелых крыс с помощью применения нейроиммуногистохимических маркеров (белок PGP 9.5, TH и Syn) в исследованных жировых подушках основания сердца были выявлены парасимпатические микроганглии, одиночные нейроны, нервные стволы, пучки и терминалы. Нервные аппараты различной медиаторной принадлежности выявлялись в презумптивной ЭЖТ крыс, начиная с первых суток постнатального развития, когда она была представлена еще эпителиальными тельцами, и далее, постоянно, на разных стадиях цито- и гистодифференцировки бурых и белых адипоцитов, бурой и белой жировых тканей.

На основании иммуногистохимического исследования показано, что на ранних этапах постнатального онтогенеза (P1–P14) в иннервации ЭЖТ существенную роль играют катехоламинергические (TH-иммунореактивные) нервные волокна, а после периода полового созревания (3–4 мес.) наблюдается выраженное разрежение катехоламинергических нервных сплетений в тканях сердца и преобладание холинергических (PGP 9.5-иммунореактивных) нервных волокон [20]. Полученные данные согласуются также с мнением о двунаправленности взаимодействия нервной и нейроэндокринной регуляции липидного обмена со стороны как периферической, так и центральной нервной системы [21–23]. Согласно концепции авторов [21–23], нервная система и, в частности, ее симпатический отдел обеспечивает регуляцию процессов метаболизма липидов через гипоталамус. Chi с соавт. [15] показали, что взаимосвязь симпатической нервной системы с развивающимися жировыми клетками у мышей возникает довольно рано – в период P6–P28 постнатального развития. Нам удалось выявить TH⁺ и PGP9.5⁺ нервные волокна и терминальные сплетения, начиная со стадии P1, до периода половозрелости и, таким образом, подтвердить участие симпатической и парасимпатической нервной системы в регуляции бурых и белых адипоцитов.

Вопрос о развитии адипоцитов белой и бурой жировых тканей в процессе онтогенеза дискуссионен. По данным литературы, белые, бурые, а также переходные формы – “бежевые” адипоциты образуются еще до формирования жирового депо [8]. Основные депо бурых адипоцитов у грызунов находятся в “подушечках” межлопаточной, подмышечной, надпочечной и парааортальной жировой ткани. Некоторые авторы считают, что большинство бурых жировых клеток происходит из клеток-предшественников эмбриональной мезодермы, из тех же, что и субпопуляции белых адипоцитов [8]. Результаты нашего исследования показали, что обе ЭЖТ сердца (бурая и белая) крысы происходят из специализированных эпителиальных телец, являющихся, по нашему мнению, закладками мезодермального зародышевого листка, это согласуется с данными литературы. Интересно отметить, что клетки эпителиальных телец по морфологическим (гистологическим и электронномикроскопическим) признакам, форме, размерам и строению митохондрий сходны с секреторными клетками фетальной коры надпочечников [14, 24]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в онтогенезе ЭЖТ может вырабатывать регуляторные биологически активные вещества, и т.о. подтверждается точка зрения, что жировые депо в организмах животных и человека кроме функций, связанных с липидным обменом, выполняют также функцию эндокринных органов [2].

В ходе исследования ЭЖТ в жировых депо “подушек” сердца нами выделены следующие клеточно-тканевые структуры, образующиеся из эпителиальных телец: эпителиоморфные преадипоциты и дифференцирующиеся адипоциты бурой ткани (в виде очаговых скопления), кластеры из бурых и белых адипоцитов – смешанная тканевая структура, и высокодифференцированная белая жировая ткань из

кольцевидных адипоцитов. Эмбриональное происхождение и морфология третьей популяции адипоцитов – “бежевых”, описанных в разных жировых депо животных, остается дискуссионным. Отмечают, что “бежевые” и бурые адипоциты могут происходить из различных клеточных линий. Предполагается, что “бежевые” клетки в подкожном депо происходят из белых зрелых адипоцитов путем трансдифференцирования или возникают *de novo* из клеток-предшественников [8, 25]. Афанасьев и Колодезникова [1] выделяют до семи типов клеток на разных стадиях дифференцировки, начиная от незрелого предшественника – “эпителиоморфной клетки”, и заканчивая терминальным периодом полной дегенерации адипоцита. На основании этих данных можно усомниться в трансдифференциации из белых адипоцитов бурых. Формирование бурой ткани в условиях эксперимента может объясняться наличием стволовых клеток-предшественников, которые, по-видимому, в течение всей жизни организма присутствуют в жировых депо человека и животных.

В наших предыдущих исследованиях для изучения иннервации сердца и других органов млекопитающих нередко применялся сравнительный анализ специальных нейроиммуногистохимических маркеров: белка PGP 9.5, TH и Syn [9, 26]. В настоящей работе применение комплекса этих маркеров позволило установить, что белая и бурая ЭЖТ и ее артериальные сосуды богато иннервированы парасимпатическими и симпатическими нервными волокнами. Эти данные дополняют сведения о наличии в дольках межлопаточного бурого жира [19, 27] нервных волокон, имеющих разную пептидергическую природу (субстанция P, NPY, CGRP, SP). Их обнаружение, по мнению авторов, согласуется с гипотезой о сенсорной и трофической функциях перечисленных пептидов.

В настоящем исследовании установлено, что чередование и распределение нервных структур разной медиаторной природы в ЭЖТ заметно изменяется в течение онтогенеза животного. Эти факты могут свидетельствовать о функциональных изменениях липидного обмена в тканях сердца. Несмотря на то, что парасимпатические нервные структуры (холинергические ганглии, нервные пучки и сплетения) появляются в субэпикарде крысы раньше катехоламинергических или симпатических, роль постганглионарных симпатических нервных волокон имеет не менее существенное значение. В настоящей работе иннервация впервые нами обнаружена в “эпителиальных тельцах” на стадиях P1–P14. Показано, что уже на этих этапах онтогенеза TH⁺пучки катехоламинергических симпатических нервных волокон и их терминальные сплетения, состоящие из варикозных аксонов, присутствуют в тельцах. Наиболее иннервируемой в онтогенезе оказалась бурая жировая ткань. По нашему мнению, именно она является более чувствительной к нервной стимуляции в ответ на внешние и внутренние факторы раздражения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью иммуногистохимических реакций на белок PGP 9.5, тирозингидроксилазу и синаптофизин в “подушках” и дольках белой и бурой жировых тканях основания сердца крысы на разных этапах онтогенеза выявлены различные катехоламинергические и холинергические нервные аппараты: ганглии, скопления хромаффинных клеток, нервные стволы, пучки сплетения, отдельные волокна, синаптические окончания. Установлено, что парасимпатические и симпатические постганглионарные нервные волокна проникают в дольки жировой ткани в составе ремаковских тяжей варикозных аксонов по артериальным сосудам, образуют терминальные синаптические сплетения типа *en passant* и участвуют в иннервации адипоцитов обоих типов ЭЖТ. Установлены важные различия в иннервации тканей. Тяжи терминальной синаптической сети симпатических и парасимпатических ва-

рикозных аксонов локализируются преимущественно в очагах бурой и смешанной жировой ткани, где находятся в тесной связи не только со стенкой артериальных сосудов, но и с бурыми адипоцитами. В белой жировой ткани тяжи варикозных аксонов выявляются в основном вокруг артериальных сосудов и практически отсутствуют между ее адипоцитами. Установленный нами факт наличия парасимпатических и симпатических нервных сплетений в ЭЖТ у новорожденных животных может свидетельствовать о важной роли автономной нервной системы в адипогенезе и липидном обмене, начиная с ранних сроков постнатального развития.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ч.Е.И. – идея работы, написание статьи; П.Е.С. – сбор и обработка материала, написание статьи; К.Д.Э. – написание и редактирование статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Афанасьев ЮИ, Колодезникова ЕД* (1995) Бурая жировая ткань. Иркутск. ИГУ. [*Afanas'ev YuI, Kolodeznikova ED* (1995) Brown adipose tissue. Irkutsk. IGU. (In Russ)].
2. *Дедов ИИ, Мельниченко ГА, Бутрова СА* (2006) Жировая ткань как эндокринный орган. Ожирение и метаболизм 1: 7–13. [*Dedov II, Melnichenko GA, Butrova SA* (2006) Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity and Metab* 1: 7–13. (In Russ)].
3. *Учасова ЕГ, Груздева ОВ, Дылева ЮА, Акбашева ОЕ* (2018) Эпикардальная жировая ткань: патофизиология и роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Бюл сибирск мед 17 (4): 254–263. [*Uchasova EG, Gruzdeva OV, Dyleva Yu A, Akbasheva OE* (2018) Epicardial adipose tissue: pathophysiology and role in the development of cardiovascular diseases. *Bull Siber Med* 17 (4): 254–263. (In Russ)]. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-4-254-263>
4. *Красильникова ТВ, Симоненкова АВ, Карабицкая НЛ, Шапкова ЕА, Баранова ЕИ* (2012) Особенности строения и функционирования жировой ткани в норме и при развитии ожирения. Ученые записки СПбГМУ им акад ИП Павлова 19(3): 99–107. [*Krasilnikova EI, Simonenkova AV, Karabitzkaya NL, Shapkova EA, Baranova EI* (2012) Features of the adipose tissue structure and functions in the norm and in obesity. *Uchenye zapiski SPbGMU im akad IP Pavlova* 19(3): 99–107. (In Russ)].
5. *Титов ВН* (2015) Функциональное различие висцеральных жировых клеток и подкожных адипоцитов. Клиническая медицина 93 (2): 14–23. [*Titov VN* (2015) The functional difference between visceral fatty cells and subcutaneous adipocytes. *Klin med* 93 (2): 14–23. (In Russ)].
6. *Bartness TJ, Ryu V* (2015) Neural control of white, beige and brown adipocytes. *Int J Obesity Suppl* 5: S35. <https://doi.org/10.1038/ijosup.2015.9>
7. *Mulya A, Kirwan JP* (2016) Brown and Beige Adipose Tissue: Therapy for Obesity and Its Comorbidities? *Endocrinol Metab Clin North Am* 45(3): 605–621. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016>
8. *Harms M, Seale P* (2013) Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 19(10): 1252–1263. <https://doi.org/10.1038/nm.3361>
9. *Chumasov EI, Petrova ES, Korzhevskii DE* (2022) Peculiarities of the Innervation of Epicardial Adipose Tissue in a Rat with Aging (Immunohistochemical Study). *Advanc Gerontol* 12(3): 310–316. <https://doi.org/10.1134/S2079057022030055>
10. *Sacks HS, Fain JN* (2007) Human epicardial adipose tissue: a review. *Am Heart J* 153(6): 907–917. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.03.019>

11. *Iacobellis G, Willens HJ* (2009) Echocardiographic epicardial fat: a review of research and clinical applications. *J Am Soc Echocardiogr* 22(12): 1311–1319.
<https://doi.org/10.1016/j.echo.2009.10.013>
12. *McKenney ML, Schultz KA, Boyd JH, Byrd JP, Alloosh M, Teague SD, Arce-Esquivel AA, Fain JN, Laughlin MH, Sacks HS, Sturek M* (2014) Epicardial adipose excision slows the progression of porcine coronary atherosclerosis. *J Cardiothorac Surg* 9: 2.
<https://doi.org/10.1186/1749-8090-9-2>
13. *Payne GA, Kohr MC, Tune JD* (2012) Epicardial perivascular adipose tissue as a therapeutic target in obesity-related coronary artery disease. *Br J Pharmacol* 165(3): 659–669.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01370.x>
14. *Giordano A, Morroni M, Santone G, Marchesi GF, Cinti S* (1996) Tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, substance P, calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in nerves of rat periovarian adipose tissue: an immunohistochemical and ultrastructural investigation. *J Neurocytol* 25(2): 125–136.
<https://doi.org/10.1007/BF02284791>
15. *Chi J, Lin Z, Barr W, Crane A, Zhu XG, Cohen P* (2021) Early postnatal interactions between beige adipocytes and sympathetic neurites regulate innervation of subcutaneous fat. *Elife* 10: e64693.
<https://doi.org/10.7554/eLife.64693>
16. *Grigorev IP, Korzhevskii DE* (2018) Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (Review). *Modern Technol Med* 10(2): 156–165.
<https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>
17. *Коржевский ДЭ, Колос ЕА* (2013) Белок PGP 9.5 и его использование в качестве функционального маркера в нейроморфологии. *Мед академ журн* 13 (4): 29–35. [*Korzhevskii DE, Kolos EA* (2013) Protein PGP 9.5 and its use as a functional marker in neuromorphology. *Med Acad J* 13(4): 29–35. (In Russ)].
18. *Колос ЕА, Григорьев ИП, Коржевский ДЭ* (2015) Маркер синаптических контактов – синаптофизин. *Морфология* 147(1): 78–82. [*Kolos EA., Grigoriyev IP, Korzhevskiy DE* (2015) A synaptic marker synaptophysin. *Morphologija* 147 (1): 78–82. (In Russ)].
19. *Norman D, Mukherjee S, Symons D, Jung RT, Lever JD* (1988) Neuropeptides in interscapular and perirenal brown adipose tissue in the rat: a plurality of innervation *J Neurocytol* 17(3): 305–311.
<https://doi.org/10.1007/BF01187853>
20. *Чумасов ЕИ, Петрова ЕС, Коржевский ДЭ* (2018) Развитие субэпикардального нервного сплетения у крысы в постнатальном периоде. *Морфология* 154(4): 20–26. [*Chumasov EI, Petrova ES, Korzhevskii DE* (2018) Development of rat subepicardial nerve plexus in the postnatal period. *Morphologija* 157 (4): 20–26. (In Russ)].
21. *Himms-Hagen J, Cui J, Lynn Sigurdson S* (1990) Sympathetic and sensory nerves in control of growth of brown adipose tissue: Effects of denervation and of capsaicin. *Neurochem Int* 17(2): 271–279.
[https://doi.org/10.1016/0197-0186\(90\)90149-n](https://doi.org/10.1016/0197-0186(90)90149-n)
22. *Geerling JJ, Boon MR, Kooijman S, Parlevliet ET, Havekes LM, Romijn JA, Meurs IM, Rensen PC* (2014) Sympathetic nervous system control of triglyceride metabolism: novel concepts derived from recent studies. *J Lipid Res* 55(2): 180–189.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R045013>
23. *Chi J, Wu Z, Choi CHJ, Nguyen L, Tegegne S, Ackerman SE, Crane A, Marchildon F, Tessier-Lavigne M, Cohen P* (2018) Three-Dimensional adipose tissue imaging reveals regional variation in beige fat biogenesis and PRDM16-Dependent sympathetic neurite density. *Cell Metab* 27: 226–236.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.011>
24. *Соколов ВИ, Чумасов ЕИ, Атагимов МЗ* (2006) Гистогенез интерренальной закладки надпочечника свиньи (*Sus domestica*). *Морфология* 129(3): 59–62. [*Sokolov VI, Chumasov YeI, Atagimov MS* (2006) The histogenesis of interrenal primordium of pig (*Sus domestica*) adrenal gland. *Morphologija* 129 (3): 59–62. (In Russ)].
25. *Sanchez-Gurmaches JJ, Hung CM, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA* (2012) PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab* 16: 348–362.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.003>
26. *Чумасов ЕИ, Колос ЕА, Петрова ЕС, Коржевский ДЭ* (2020) Иммуногистохимия периферической нервной системы. СПб. СпецЛит. [*Chumasov EI, Kolos EA, Petrova ES, Korzhevskij DE* (2020) Immunohistochemistry of the peripheral nervous system. SPb. SpecLit. (In Russ)].
27. *De Matteis R, Ricquier D, Cinti S* (1998) TH-, NPY-, SP-, and CGRP-immunoreactive nerves in interscapular brown adipose tissue of adult rats acclimated at different temperatures: an immunohistochemical study. *J Neurocytol* 27(12): 877–886.
<https://doi.org/10.1023/a:1006996922657>

Morphological Peculiarities of the Rat Epicardial Fatty Tissue Innervation in Early Postnatal Ontogenesis**E. I. Chumasov^{a, b, *}, E. S. Petrova^a, and D. E. Korzhevskii^a**^a*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*^b*St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia***e-mail: iemmorphol@yandex.ru*

The aim of the study was to study the structure and innervation of the epicardial adipose tissue (EAT) of the aortic-pulmonary region of the rat heart at early stages of development and in adult animals (1 day, 14 days, 3–4 months). Histological methods (staining with hematoxylin-eosin and toluidine blue), as well as immunohistochemical methods for identifying nerve structures (PGP 9.5 protein, tyrosine hydroxylase, synaptophysin) were used in the work. Histogenesis and differentiation of EAT adipocytes have been studied. It has been established that presumptive anlagen of “fat pads” from brown and white adipose tissue of the heart are formed from “epithelial bodies” located at the base of the main vessels of the aortic-pulmonary region of a newborn rat. According to the authors, it is the epitheliomorphic tissue that is the cambial tissue and is the source of adipose tissue stem cells. White adipose tissue, represented by ring-shaped adipocytes, responsible for the synthesis and accumulation of triglycerides and constituting the main part of the fat depot, is its derivative. It has been shown that the histogenesis of brown and white adipose tissue from the first day of birth is accompanied by vasculogenesis. At the same time, terminal plexuses of catecholaminergic and cholinergic varicose axons, which are distant synaptic apparatuses en passant, are formed in adipose tissue. It has been established that catecholaminergic postganglionic sympathetic terminal axons predominate in the early stages (P1–P14), during the period of fat cell differentiation. A decrease in catecholaminergic and a predominance of cholinergic (PGP9.5+) nerve fibers in mature (3–4 months) animals were noted.

Keywords: rat epicardial adipose tissue, ontogenesis, innervation, PGP 9.5 protein, tyrosine hydroxylase, synaptophysin, immunohistochemistry

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВРЕМЯ СУТОК НАНЕСЕНИЯ УДАРА ВЛИЯЕТ НА ВЫРАЖЕННОСТЬ
НЕМЕДЛЕННЫХ СУДОРОГ И ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ КОРТИКОСТЕРОНА
ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ**

© 2022 г. И. Г. Комольцев^{1, 2}, С. О. Франкевич^{1, 2}, Н. И. Широбокова¹,
О. В. Костюнина¹, А. А. Волкова¹, Д. А. Башкатова¹, Д. В. Шальнева¹,
П. А. Кострюков¹, О. Ю. Салып¹, М. Р. Новикова¹, Н. В. Гуляева^{1, 2, *}

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

²Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева, Москва, Россия

*E-mail: nata_gul@ihna.ru

Поступила в редакцию 21.09.2022 г.

После доработки 07.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) в отдаленном периоде часто сопровождается психическими и неврологическими расстройствами. Глюкокортикоиды, регулирующие физиологический ответ организма на острый и хронический стресс, могут быть связаны с запуском длительных изменений в гиппокампе, отвечающих за развитие отдаленных последствий ЧМТ. Известно, что уровень кортизола у человека и кортикостерона у крыс в течение суточного цикла изменяется в широких пределах, и циркадианный ритм глюкокортикоидов влияет на стресс-реактивность организма. В данной работе мы проанализировали влияние времени нанесения латерального гидродинамического удара (ЛГУ) у крыс на развитие немедленных спровоцированных судорог и повышение уровня кортикостерона в остром периоде ЧМТ. Операции и нанесение ЛГУ проводили с 9:00 до 22:00. Животных выводили из эксперимента на 1-, 3-, 7- и 14-й день после ЧМТ с 10:00 до 12:00, что соответствовало низкому суточному уровню кортикостерона у крыс. Впервые показано, что время нанесения ЧМТ является значимым фактором, влияющим на повышение уровня кортикостерона в остром периоде ЧМТ: чем раньше проводили ЛГУ, тем выше был уровень кортикостерона у крыс в декапитационной крови ($r = -0.56$, $p = 0.0004$). Кроме того, при нанесении ЛГУ в утренние часы у животных длительность тонических судорог, а также представленность тонических судорог и прыжков были выше по сравнению с животными с травмой в вечерние часы. Таким образом, время нанесения ЧМТ является значимым фактором степени физиологического стресса на травму и может сказываться на развитии ее отдаленных последствий.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, циркадианные ритмы, кортикостерон, стресс, судорожные приступы

DOI: 10.31857/S086981392212007X

Травма головного мозга является распространенной причиной смерти и инвалидности людей всех возрастов и социальных слоев населения [1, 2]. В то время как смертность в результате черепно-мозговой травмы (ЧМТ) снизилась с 50 до 25% за последние 30 лет, поздние посттравматические тяжелые неврологические и психические расстройства становятся все более распространенным осложнением [3]. Посттравматическая эпилепсия, тяжелое осложнение ЧМТ, встречается у 10–20%

пациентов [4]. Показано, что ранние судорожные приступы повышают вероятность развития посттравматической эпилепсии [5]. Предположительно, эффекты глюкокортикостероидов (ГКС) имеют решающее значение в развитии дистантного повреждения гиппокампа и критически определяются конкретными аспектами их воздействия [6]. Согласно нашим данным, опубликованным ранее, длительные немедленные судороги ассоциированы с увеличением уровня кортикостерона в остром периоде ЧМТ у крыс [7]. Нами также было показано, что уровень кортикостерона в остром периоде ЧМТ влияет на выраженность дистантного повреждения гиппокампа [7].

Хорошо известно, что уровень кортизола у человека и кортикостерона у крыс в течение суточного цикла изменяется в широком диапазоне [8]. ГКС оказывают модулирующие эффекты на возбудимость нейронов, потенцируют эксайтотоксическое повреждение [9, 10] и повышают восприимчивость к судорогам [11]. Геномные локусы связывания рецепторов ГКС насчитывают сотни участков ДНК, которые активно изменяются в течение суточного цикла [12]. Нейрональные регуляторы гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО), играющей важную роль в развитии стрессорных реакций, имеют множественные связи с центрами циркадианных ритмов в гипоталамусе [13]. Высокий уровень ГКС и предшествующий стресс усугубляют повреждение гиппокампа после фокального повреждения мозга [14], в первую очередь инсультов у людей и на моделях инсульта у крыс [15]. В эксперименте также показано, что моделирование иммобилизационного стресса у крыс в течение 15 мин в утренние часы приводит к более выраженному ответу на стресс (уровню АКТГ, кортикостерона, цАМФ и др.) [16]. Таким образом, можно предположить, что время суток при моделировании ЧМТ может влиять на выраженность стрессорной реакции (по секреции кортикостерона в кровь) в остром периоде ЧМТ и выраженности немедленных судорог как показателя возбудимости нейронов. Цель настоящего исследования – выявить влияние времени нанесения латерального гидродинамического удара у крыс на развитие немедленных спровоцированных судорог и уровень кортикостерона в остром периоде ЧМТ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты с животными выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. и “Правилами лабораторной практики”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (№ 708н г. от 23.08.2010). Протокол эксперимента утвержден Этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (протокол № 2 от 24.05.2017). Были предприняты все меры для уменьшения числа используемых животных и минимизации их страданий.

Животные

Исследование проведено на 85 самцах крыс линии Вистар в возрасте 6 мес. и массой тела около 380 г. Животных содержали в виварии в стандартных условиях, со свободным доступом к пище и воде.

Экспериментальные группы

Животные были разделены на три группы: 36 крысам после трепанации черепа наносили латеральный гидродинамический удар (ЛГУ), 40 крыс составляли группу ложноперированных животных, и 9 животных – интактную контрольную группу.

Животных выводили из эксперимента на 1-е, 3-и, 7-е и 14-е сутки (17, 17, 19 и 23 крысы соответственно) для биохимического анализа.

Нанесение ЧМТ и регистрация немедленных судорог

Трепанацию черепа проводили под изофлурановым наркозом (1–3%-ная газовая смесь). Диаметр отверстия в правой теменной кости составлял 3 мм. Отверстие располагалось на 3 мм каудальнее брегмы и на 3 мм латеральнее срединной линии. Визуально оценивалась интактность твердой мозговой оболочки, животные с повреждениями исключались из эксперимента. Наконечник типа Люэр-Лок приклеивали к месту краниотомии цианоакрилатным клеем с последующей фиксацией зубным цементом. Животных после операции извлекали из стереотаксиса и помещали в квадратную пенопластовую коробку со стороной 60 и высотой 40 см, для защиты крысы от дополнительной травмы во время острых судорог после нанесения ЛГУ. После выхода из наркоза крыс подключали к аппарату для нанесения ЛГУ (Fluid Percussion Device with a PC-Based Pressure Measurement Unit, Model FP302, США) с помощью 80-сантиметровой поливинилхлоридной трубки диаметром 3 мм. Сила удара составляла 3.03 ± 0.03 атм. В течение последующих периодов немедленного приступа и восстановления рефлексов животных тестировали, как описано ниже. Были сделаны видеозаписи момента травмы, непосредственных острых приступов, вызванных травмой, и последующего периода восстановления. После ЧМТ животных возвращали в домашние клетки. Критериями исключения были неудачная операция, повреждение твердой мозговой оболочки, наличие клея на твердой мозговой оболочке.

Анализ немедленных судорог

Был проведен визуальный анализ всех полученных записей. Каждая запись была разделена на периоды, соответствующие элементам немедленных судорог. Измеряли длительность этих периодов и анализировали последовательность элементов судорог. Отмечали, начался ли приступ с серии прыжков и фиксировали латерализацию этих прыжков; измеряли общую продолжительность эпизода судорог, продолжительность и латерализацию побежки, продолжительность клонических и тонических элементов судорог и судороги хвоста, латерализацию клонических судорог. Регистрировали продолжительность апноэ, диспноэ и гипопноэ, отмечали признаки цианоза конечностей. Регистрировали длительность восстановления вестибуло-спинального рефлекса и способности крыс сохранять позу. Проверяли реакцию чувствительности хвоста на болевое раздражение (путем защемления кончика хвоста крысы). При тестировании вестибуло-спинального рефлекса наклоняли животных вправо и влево. Отмечали восстановление правого или левого вестибуло-спинального рефлекса, если крысе удавалось вернуться в исходное положение.

Биохимический анализ

Животных выводили из эксперимента путем быстрой декапитации, собирали декапитационную кровь и центрифугировали при 1500 g и 4°C в течение 15 мин для получения сыворотки. Сыворотку крови использовали для определения уровня кортикостерона методом иммуноферментного анализа. Мозг извлекали сразу после декапитации и охлаждали в солевом растворе, выделяли гиппокампы обеих полушарий. Образцы гомогенизировали с использованием гомогенизатора Поттера в десятикратном избытке холодного буфера для гомогенизации (10 ударами пестика при скорости вращения 1000 об./мин в растворе 0.1%-ного NP-40, ингибитора протеаз (Roche) в фосфатно-солевом растворе). Концентрацию кортикостерона выра-

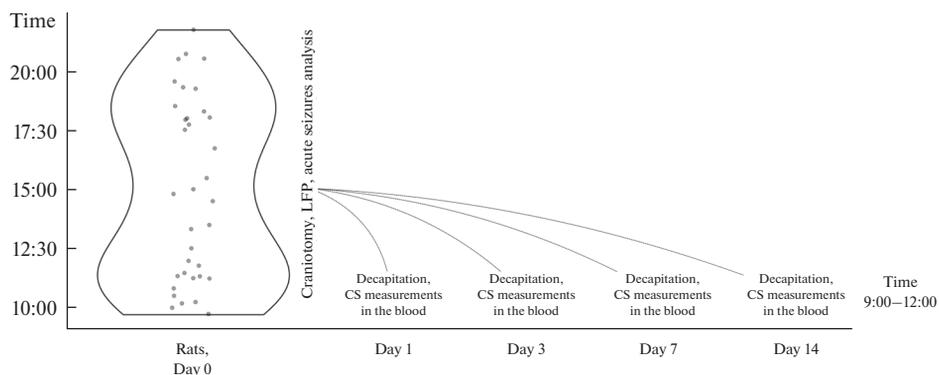


Рис. 1. Схема эксперимента. В левой части схемы представлено распределение животных с ЧМТ по времени нанесения ЧМТ (ось ординат соответствует времени нанесения ЧМТ). Животных выводили из эксперимента на 1-, 3-, 7- и 14-й день после ЛГУ. Операции и нанесение ЧМТ проводили с 9:00 до 22:00. Время декапитации с 10:00 до 12:00, что соответствовало низкому суточному уровню кортикостерона.

жали в нг/мл супернатанта. Аликвоты супернатантов хранили при температуре -80°C . Для измерения уровня кортикостерона в сыворотке крови и в супернатантах мозга использовали наборы для иммуноферментного анализа (Corticosterone ELISA, DRG, Германия), которые определяли как свободный, так и связанный кортикостерон с помощью метода конкурентного иммуноферментного анализа. Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр для считывания микропланшетов Hidex Sense (HIDEX, Финляндия).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA 12 (StatSoft, Оклахома, Талса, США) и Jamovi 1.6 (Сидней, Австралия). Визуализация и корреляционный анализ были выполнены с использованием программы Prism 8 (GraphPad, Калифорния, Сан-Диего, США). Для оценки нормальности распределений использовали тест Шапиро–Уилка. Тест Манна–Уитни применялся для сравнения независимых переменных (ложнооперированные против ЧМТ). Корреляционный анализ проводили методом Спирмена. Кластерный анализ проводили с использованием метода К-средних на 2 группы и последующим их сравнением непараметрическим тестом Манна–Уитни. Для сравнения количества животных с наличием или отсутствием элементов немедленных судорог использовали двунаправленный точный тест Фишера. Все данные представлены в виде $M \pm SEM$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Повышение уровня кортикостерона в крови и гиппокампе

В 1-й день после ЧМТ повышение кортикостерона в крови наблюдалось у некоторых животных, но это повышение не было статистически значимым (рис. 2а). При сравнении с ложнооперированными крысами на 3-й день после ЧМТ уровень кортикостерона одновременно повышался в крови (543.9 ± 118.1 против 964.1 ± 108.0 нг/мл, $p < 0.05$), в ипсилатеральном и контралатеральном гиппокампе (23.0 ± 4.0 против 40.7 ± 6.0 нг/мл, $p < 0.05$, и 22.4 ± 3.2 против 34.0 ± 5.7 нг/мл, $p < 0.05$ соответственно). Уровень кортикостерона в крови коррелировал с его уровнем в ипси- ($r = 0.66$, $p < 0.001$) и контралатеральном гиппокампе ($r = 0.68$, $p < 0.005$).

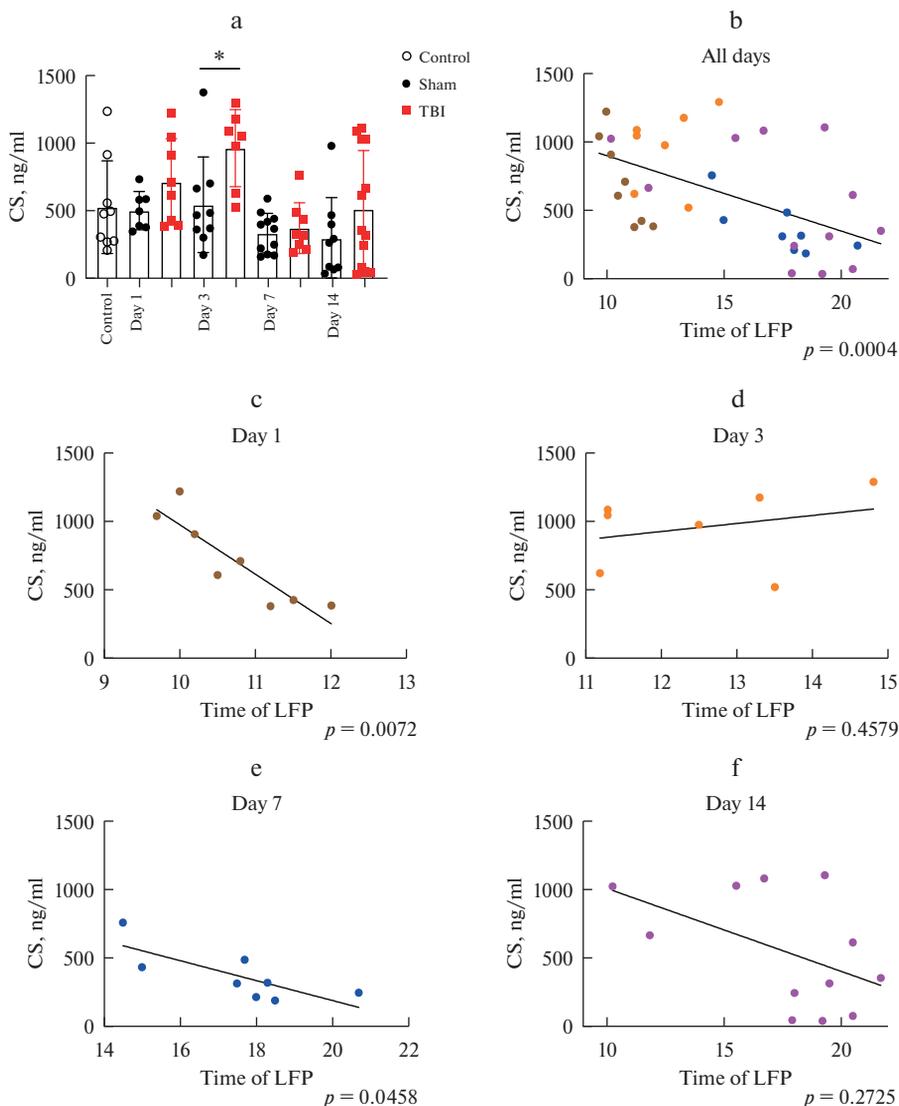


Рис. 2. Зависимость уровня кортикостерона в декапитационной крови от времени нанесения ЧМТ. (a) – уровни кортикостерона на 1-й (коричневый), 3-й (оранжевый), 7-й (синий) и 14-й (фиолетовый) дни после ЧМТ. (b) – корреляция времени нанесения ЧМТ и уровня кортикостерона в декапитационной крови (при включении в анализ всех животных с ЧМТ). (c–f) – корреляция времени нанесения ЧМТ и уровня кортикостерона в декапитационной крови в 1-, 3-, 7- и 14-й дни соответственно. * – $p < 0.05$, тест Манна–Уитни.

Корреляция времени нанесения ЧМТ и уровня кортикостерона в остром периоде ЧМТ

Гистограммы распределения времени нанесения ЛГУ и концентрации кортикостерона имели два максимума – на высоких и низких значениях, и тип распределения обоих показателей был отличен от нормального (тест Шапиро–Уилка, $p < 0.01$).

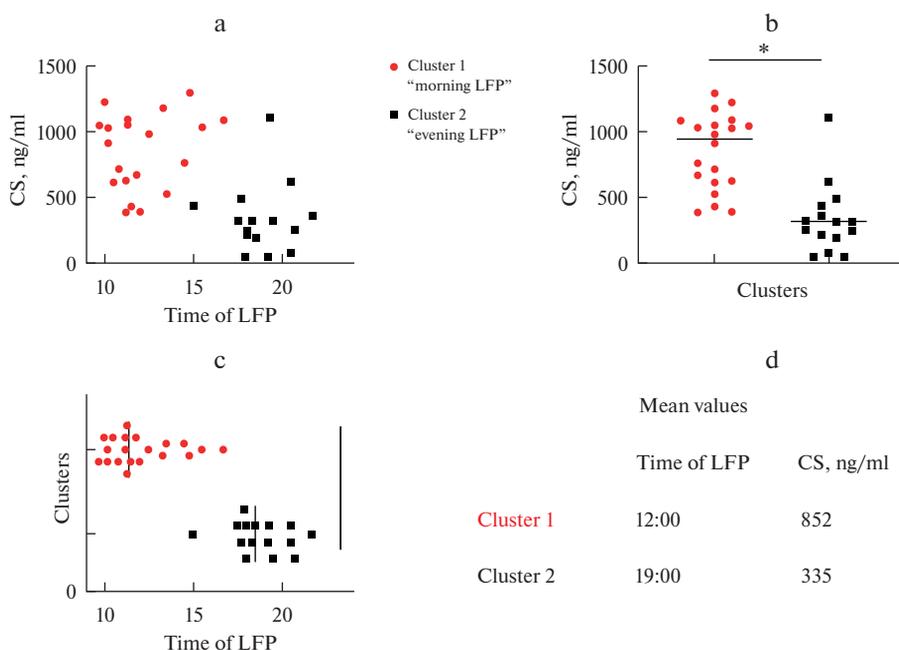


Рис. 3. Кластерный анализ: группы крыс с ЛГУ в утренние и вечерние часы. (а) – разделение крыс по уровню кортикостерона в декапитационной крови и времени нанесения ЧМТ на два кластера. (б) – сравнение уровня кортикостерона в декапитационной крови у крыс кластера 1 и 2. (с) – сравнение времени нанесения у крыс кластера 1 и 2. (д) – средние значения времени нанесения ЧМТ и уровня кортикостерона в декапитационной крови у крыс кластеров 1 и 2. * – $p < 0.05$, тест Манна–Уитни.

Установлено, что время нанесения ЧМТ коррелировало с повышением уровня кортикостерона при декапитации (при включении в анализ всех животных, $r = -0.56$, $p = 0.0004$, корреляция Спирмена) (рис. 2b). При анализе уровня кортикостерона в декапитационной крови (рис. 2b–с) этот показатель в 1-й день ($r = -0.88$, $p = 0.007$) и 7-й день ($r = 0.74$, $p < 0.05$) достоверно коррелировал со временем нанесения ЧМТ. Таким образом, чем раньше в течение дня проводили ЛГУ, тем выше был уровень кортикостерона в остром периоде ЧМТ (в утренние часы с базальным низким уровнем кортикостерона).

Выделение групп крыс с нанесением ЧМТ в разное время суток

На следующем этапе мы провели кластерный анализ методом К-средних для разделения крыс на две более однородные группы и их сравнения (рис. 4). По времени нанесения ЧМТ и уровню кортикостерона в остром периоде ЧМТ крысы достоверно разделялись на два кластера:

- 1) Кластер 1, $n = 20$ (57% животных) с ЛГУ в утренние часы (около 12:00) и высоким уровнем кортикостерона при декапитации (852 нг/мл) – “утренняя ЧМТ”;
- 2) Кластер 2, $n = 15$ (43% крыс) с ЛГУ в вечерние часы (около 19:00) и более низким уровнем кортикостерона при декапитации (335 нг/мл) – “вечерняя ЧМТ”.

При сравнении этих двух кластеров достоверно отличались среднее время нанесения ЧМТ (12.2 ± 0.4 против 18.8 ± 0.4 ч, $p < 0.05$) и средний уровень кортикостерона (852 ± 65 против 335 ± 69 нг/мл, $p < 0.05$) (рис. 3).

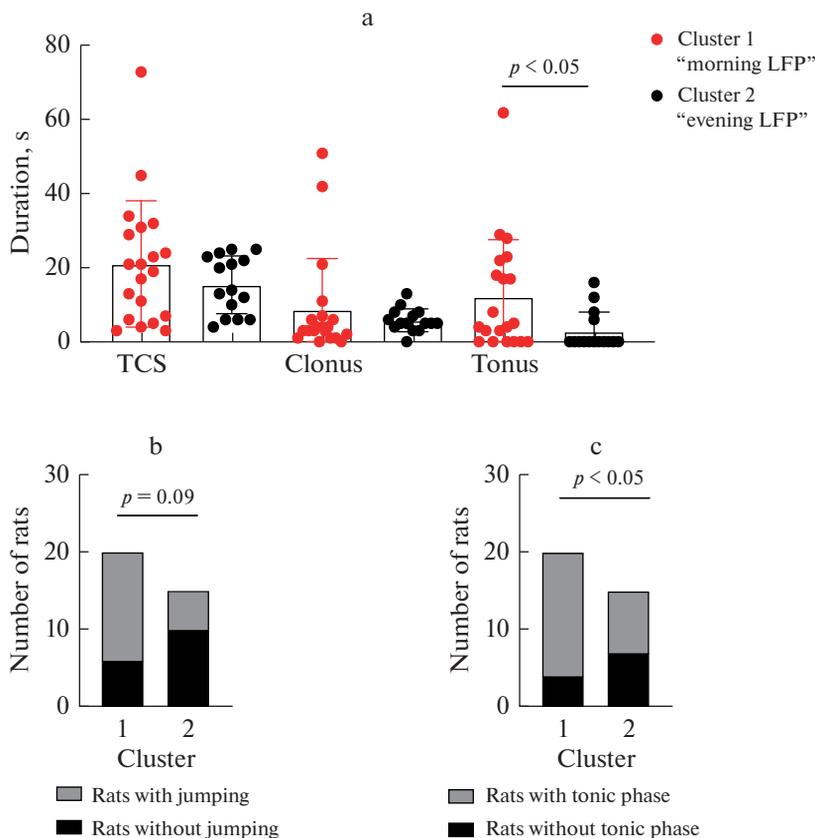


Рис. 4. Сравнение семиологии немедленных судорожных приступов у крыс с ЛГУ в утренние и вечерние часы. (a) – общая длительность судорожного приступа, а также ее тонических и клонических элементов. Длительность тонических судорог была выше у крыс с ЛГУ в утренние часы. (b) – представленность прыжков у крыс с ЛГУ в утренние и вечерние часы. (c) – представленность тонических судорог у крыс с ЛГУ в утренние и вечерние часы.

Семиология немедленных приступов зависела от времени нанесения ЧМТ

Мы провели сравнение длительности немедленных судорог для ЛГУ, нанесенного в утренние и вечерние часы. Характеристики немедленных судорог после ЧМТ опубликованы нами ранее [7], но подобный анализ зависимости от времени нанесения ЛГУ проведен впервые. Длительность тонических приступов была выше для крыс кластера 1, “утренняя ЧМТ” (12 ± 3 с против 3 ± 1 с) по сравнению с группой крыс с “вечерней ЧМТ”. Кроме того, у крыс с “утренней ЧМТ” при сравнении с “вечерней ЧМТ” количество животных с наличием конкретных элементов судорог также отличалась. Представленность тонических приступов была выше (14 из 19 против 6 из 16, $p < 0.05$), а число крыс с наличием прыжков во время начала приступов отличалось на уровне статистической тенденции (16 из 24 против 4 из 11, $p = 0.09$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уровень ГКС в течение суток у животных и человека изменяется в широком диапазоне [8]. Результаты данного исследования впервые демонстрируют, что вре-

мя нанесения ЛГУ у крыс является одним из факторов, определяющим уровень кортикостерона в остром периоде ЧМТ, а характер немедленных судорог изменяется в зависимости от времени суток при моделировании травмы.

Нарушения в работе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) являются одним из предположительных механизмов развития поздних осложнений ЧМТ, таких как тревожно-депрессивные расстройства и посттравматическая эпилепсия. Кортикостерон (аналог кортизола человека у животных) имеет сложное влияние на процессы нейровоспаления, усиливает эксайтотоксичность и способен модулировать возбудимость нейронов в головном мозге [9, 10].

Нарушения работы ГГНО у пациентов с ЧМТ

Клинические исследования уровня кортизола в остром периоде ЧМТ ограничены. Показано, что уровень кортизола после ЧМТ может быть как понижен [17], так и повышен [18], что связано, в частности, с отсутствием достаточного количества данных о временной динамике гормона. ЧМТ как острый физиологический стресс приводит к повышению уровня кортизола у пациентов с ЧМТ при сохранной функции ГГНО. Однако у некоторых пациентов с ЧМТ развивается дисфункция переднего или заднего отделов гипофиза, что, в свою очередь, приводит ко вторичному гипокортицизму (снижению уровня кортизола вследствие снижения выработки адренкортикотропного гормона гипофиза, АКТГ). В исследовании [19] показано, что при стимуляции выработки АКТГ и кортизола при помощи введения глюкагона у пациентов с ЧМТ наблюдается нормальный или сниженный ответ на тест; у пациентов со сниженным ответом базальный уровень кортизола после ЧМТ понижен, а у пациентов с нормальным ответом — повышен. Факторами риска надпочечниковой недостаточности и снижения уровня кортизола в остром периоде ЧМТ являются переломы основания черепа, гипотензия и использование пропופола [20]. В целом признаки более легких ЧМТ — отсутствие амнезии и больший балл по шкале комы Глазго (более легкие травмы) — ассоциированы с более высоким уровнем кортизола [21]. Кроме того, динамика уровня кортизола в первые недели после ЧМТ зависит и от исходного уровня активации ГГНО. Показано, что у пациентов, перенесших стрессовые события до травмы головного мозга, при сравнении с пациентами без стресса перед ЧМТ, уровень кортизола достоверно снижался, а не повышался, как это обычно происходило у пациентов без предшествующего стресса.

Роль кортикостерона в развитии дистантного повреждения гиппокампа

Во время реакции на стресс ГКС связываются со своими рецепторами и модулируют функцию гиппокампа, влияя на многочисленные сигнальные и метаболические системы [22]. Предположительно, эффекты ГКС в гиппокампе имеют решающее значение в развитии двустороннего повреждения гиппокампа, в том числе при ЧМТ. Хорошо известно, что ГКС регулируют поведенческую реакцию на стресс, и их рецепторы широко экспрессируются в гиппокампе. Эффекты ГКС критически определяются конкретными аспектами их воздействия [6]. Функции ГКС в гиппокампе опосредуются высокоаффинными минералокортикоидными и низкоаффинными глюкокортикоидными рецепторами, последние активируются высокими уровнями ГКС. Существуют два типа этих рецепторов: цитоплазматические/ядерные рецепторы, связанные с медленным геномным действием, и негеномные мембраносвязанные рецепторы, быстро изменяющие возбуждающую нейромедиацию [23]. Геномные локусы связывания этих двух типов рецепторов насчитывают сотни участков ДНК, которые частично перекрываются, активно изменяются в течение суточного цикла и особенно — под действием острого стресса [12]. В основном геномные эффекты связаны с процессами адаптации, синаптической и нейронной пластичности. ГКС так-

Таблица 1. Распределение числа крыс кластеров 1 и 2 по дням выведения из эксперимента

Кластер	День 1-й	День 3-й	День 7-й	День 14-й	Сумма
1 (утренняя ЧМТ)	8	7	1	4	20
2 (вечерняя ЧМТ)	0	0	7	8	15
Сумма	8	7	8	12	35

Точный тест Фишера, $p = 0.000131$.

же дозозависимо влияют на возбудимость нейронов: глутаматергическая синаптическая передача усиливается низкими дозами кортикостерона, действующими на мембранные минералокортикоидные рецепторы (быстрая реакция на стресс), и снижается более высокими дозами, действующими на глюкокортикоидные рецепторы (восстановление после стрессовой ситуации) [23, 24].

ГКС регулируют возбудимость нейронов, нейровоспаление и могут играть ключевую роль в чувствительности гиппокампа к первоначальному эксайтотоксическому повреждению и дальнейшей вторичной гибели нейронов [9]. Влияние ГКС на судороги у крыс реализуется через модуляцию возбудимости и повышение восприимчивости к судорогам [11]. Показано также, что кортикотропин-рилизинг фактор у крыс с ЧМТ непосредственно способен повышать возбудимость амигдалы и гиппокампа и приводить к появлению патологических высокочастотных осцилляций [25]. Кроме того, ГКС повышают уязвимость нейронов к эксайтотоксичности [10]. Механизмы этих эффектов ГКС включают подавление транспорта глюкозы, обратного захвата глутамата астроцитами, изменение гомеостаза Ca^{2+} и подавление продукции нейротрофических факторов [26, 27]. ГКС проявляют либо про-, либо противовоспалительные свойства в зависимости от степени и продолжительности воздействия, внешних факторов, предшествующих ЧМТ, и характеристик травмы [6, 28, 29]. Важно отметить, что повышенный уровень ГКС перед провоспалительным стимулом оказывает дополнительный провоспалительный эффект [30]. Это подтверждается и тем фактом, что высокий начальный уровень ГКС и предшествующий стресс усугубляют повреждение гиппокампа после инсультов в эксперименте и клинике [15].

Опираясь на данные фундаментальных исследований, можно предполагать, что в основе долговременных последствий ЧМТ может лежать измененный физиологический ответ на острый стресс, однако убедительные клинические исследования в этой области на данный момент отсутствуют. Многие клинические исследования показали, что противоэпилептическое лечение, влияющее на эпилептиформную активность в раннем периоде травмы, не предотвращает развитие посттравматической эпилепсии [31, 32]. Разработка новых способов влияния на ГНО для предотвращения долговременных последствий ЧМТ является перспективным направлением в этой области.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данном эксперименте время забора крови на уровень кортикостерона было выбрано 10:00–12:00 (низкий базальный уровень кортикостерона у крыс как преимущественно ночных животных). Из-за необходимости строгого соблюдения времени от ЧМТ до биохимического анализа на более ранних сроках после ЧМТ, животные из каждого “временного” кластера оказались неравномерно распределены по дням вывода их из эксперимента. Как видно из табл. 1, все крысы, выведенные на 1- и 3-й день после ЧМТ попадали в кластер 1 (“утренняя” ЧМТ), а большинство крыс, выведенных из эксперимента на 7-й день после ЧМТ, пришлось на кластер 2 (“вечерняя ЧМТ”). Данная неравномерность включения крыс в кластеры

может иметь некоторый вклад в выявленные различия по уровню кортикостерона между кластерами. Тем не менее, корреляции уровня кортикостерона и времени нанесения ЧМТ, представленные на рис. 1, наблюдались в разные дни независимо друг от друга, а взаимосвязь семиологии острых судорог и времени нанесения ЧМТ не зависела от сроков вывода крыс из эксперимента.

ВЫВОДЫ

Впервые показано, что время нанесения ЧМТ является значимым фактором, влияющим на повышение уровня кортикостерона в остром периоде ЧМТ: чем раньше проводили ЛГУ, тем выше был уровень кортикостерона у крыс в декапитационной крови. У крыс при нанесении ЛГУ в утренние часы длительность тонических судорог, а также представленность тонических судорог и прыжков были выше. Таким образом, время нанесения ЧМТ является значимым фактором степени физиологического стресса на травму и может сказываться на развитии ее отдаленных последствий.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АКТГ	адренокортикотропный гормон
ГНО	гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось
ГКС	глюкокортикостероиды
ЛГУ	латеральный гидродинамический удар
ЧМТ	черепно-мозговая травма

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-25-00713.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

И.Г.К. – проведение операций на животных, подготовка текста статьи, статистический анализ, визуализация; С.О.Ф. – анализ немедленных судорог; Н.И.Ш. и О.В.К. – проведение иммуноферментного анализа; А.А.В. и Д.А.Б. – проведение операций на животных; Д.В.Ш. и П.А.К. – уход за прооперированными животными, получение и обработка образцов мозга; О.Ю.С. и М.Р.Н. – забор крови и подготовка текста статьи; Н.В.Г. – планирование эксперимента, окончательное редактирование текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M* (2020) Traumatic Brain Injury. *Med Clin North Am* 104: 213–238.
<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.11.001>
2. *Rozenbeek B, Maas AIR, Menon DK* (2013) Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 9: 231–236.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.22>
3. *Lu J, Marmarou A, Choi S, Maas A, Murray G, Steyerberg EW* (2005) Mortality from traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl* 95: 281–285.
4. *Annegers JF, Hauser WA, Coan SP, Rocca WA* (1998) A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. *N Engl J Med* 338: 20–24.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199801013380104>
5. *Pagni CA, Zenga F* (2005) Posttraumatic epilepsy with special emphasis on prophylaxis and prevention. *Acta Neurochir Suppl* 93: 27–34.

6. *Sorrells SF, Caso JR, Munhoz CD, Sapolsky RM* (2009) The Stressed CNS: When Glucocorticoids Aggravate Inflammation. *Neuron* 64: 33–39.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.032>
7. *Komoltsev IG, Frankevich SO, Shirobokova NI, Volkova AA, Onufriev MV, Moiseeva JV, Novikova MR, Gulyaeva NV* (2021) Neuroinflammation and Neuronal Loss in the Hippocampus Are Associated with Immediate Posttraumatic Seizures and Corticosterone Elevation in Rats. *Int J Mol Sci* 22: 5883.
<https://doi.org/10.3390/ijms22115883>
8. *Atkinson HC, Waddell BJ* (1997) Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle. *Endocrinology* 138: 3842–3848.
<https://doi.org/10.1210/endo.138.9.5395>
9. *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>
10. *Sorrells SF, Munhoz CD, Manley NC, Yen S, Sapolsky RM* (2014) Glucocorticoids Increase Excitotoxic Injury and Inflammation in the Hippocampus of Adult Male Rats. *Neuroendocrinology* 100: 129–140.
<https://doi.org/10.1159/000367849>
11. *Roberts AJ, Donald Keith L* (1995) Corticosteroids enhance convulsion susceptibility via central mineralocorticoid receptors. *Psychoneuroendocrinology* 20: 891–902.
[https://doi.org/10.1016/0306-4530\(95\)00016-X](https://doi.org/10.1016/0306-4530(95)00016-X)
12. *Mijfsud KR, Kennedy CLM, Salatino S, Sharma E, Price EM, Haque SN, Gialeli A, Goss HM, Panchenko PE, Broxholme J, Engledow S, Lockstone H, Cordero Llana O, Reul JM* (2021) Distinct regulation of hippocampal neuroplasticity and ciliary genes by corticosteroid receptors. *Nat Commun* 12: 4737.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24967-z>
13. *Koch CE, Leinweber B, Drengberg BC, Blaum C, Oster H* (2017) Interaction between circadian rhythms and stress. *Neurobiol Stress* 6: 57–67.
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.09.001>
14. *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>
15. *Gulyaeva NV, Onufriev MV, Moiseeva YV* (2021) Ischemic Stroke, Glucocorticoids, and Remote Hippocampal Damage: A Translational Outlook and Implications for Modeling. *Front Neurosci* 15: 781964.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.781964>
16. *Kant J, Mougey EH, Meyerhoff JL* (1986) Diurnal Variation in Neuroendocrine Response to Stress in Rats: Plasma ACTH, β -Endorphin, β -LPH, Corticosterone, Prolactin and Pituitary Cyclic AMP Responses. *Neuroendocrinology* 43: 383–390.
<https://doi.org/10.1159/000124553>
17. *Kusmenkov T, Braunstein M, Schneider H, Bidlingmaier M, Prall W, Flatz W, Boecker W, Bogner V* (2019) Initial free cortisol dynamics following blunt multiple trauma and traumatic brain injury: A clinical study. *J Int Med Res* 47: 1185–1194.
<https://doi.org/10.1177/0300060518819603>
18. *Kakati A, Devi BI, Bhadrinarayan V, Kalra P, Shukla D* (2013) Endocrine dysfunction following traumatic brain injury in acute stage. *Indian J Neurotrauma* 10: 92–96.
<https://doi.org/10.1016/j.ijnt.2013.10.002>
19. *Agha A, Rogers B, Mylotte D, Taleb F, Tormey W, Phillips J, Thompson CJ* (2004) Neuroendocrine dysfunction in the acute phase of traumatic brain injury. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60: 584–591.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.02023.x>
20. *Bensalah M, Donaldson M, Aribi Y, Iabassen M, Cherfi L, Nebbal M, Medjaher M, Haffaf E, Abdennebi B, Guenane K, Djermane A, Kemali Z, OuldKablia S* (2018) Cortisol evaluation during the acute phase of traumatic brain injury—A prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 88: 627–636.
<https://doi.org/10.1111/cen.13562>
21. *Tanriverdi F, Schneider HJ, Aimaretti G, Masel BE, Casanueva FF, Kelestimur F* (2015) Pituitary Dysfunction After Traumatic Brain Injury: A Clinical and Pathophysiological Approach. *Endocr Rev* 36: 305–342.
<https://doi.org/10.1210/er.2014-1065>
22. *Gulyaeva NV* (2015) Ventral hippocampus, Stress and Psychopathology: Translational implications. *Neurochem J* 9: 85–94.
<https://doi.org/10.1134/S1819712415020075>
23. *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>

24. Gulyaeva N (2021) Glucocorticoid Regulation of the Glutamatergic Synapse: Mechanisms of Stress-Dependent Neuroplasticity. *J Evol Biochem Physiol* 57: 564–576.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021030091>
25. Narla C, Jung PS, Bautista Cruz F, Everest M, Martinez-Trujillo J, Poulter MO (2019) CRF Mediates Stress-Induced Pathophysiological High-Frequency Oscillations in Traumatic Brain Injury. *eNeuro* 6 (2).
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0334-18.2019>
26. Mattson MP (2019) Excitotoxicity. In: *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology*. Elsevier. 125–134.
27. Virgin CE, Ha TP, Packan DR, Tombaugh GC, Yang SH, Homer HC, Sapolsky RM (1991) Glucocorticoids Inhibit Glucose Transport and Glutamate Uptake in Hippocampal Astrocytes: Implications for Glucocorticoid Neurotoxicity. *J Neurochem* 57: 1422–1428.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08309.x>
28. 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>
29. Gulyaeva NV (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>
30. Frank MG, Miguel ZD, Watkins LR, Maier SF (2010) Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 24: 19–30.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.07.008>
31. Piccenna L, Shears G, O'Brien TJ (2017) Management of post-traumatic epilepsy: An evidence review over the last 5 years and future directions. *Epilepsia Open* 2: 123–144.
<https://doi.org/10.1002/epi4.12049>
32. Christensen J (2015) The Epidemiology of Posttraumatic Epilepsy. *Semin Neurol* 35: 218–222.
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1552923>

Acute Corticosterone Elevation and Immediate Seizure Expression in Rats Depends on the Time of the Day when Lateral Fluid Percussion Brain Injury Has Been Applied

I. G. Komoltsev^{a, b}, S. O. Frankevich^{a, b}, N. I. Shirobokova^a, O. V. Kostyunina^a, A. A. Volkova^a, D. A. Bashkatova^a, D. V. Shalneva^a, P. A. Kostrukov^a, O. Yu. Salyp^a, M. R. Novikova^a, and N. V. Gulyaeva^{a, b, *}

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

^b*Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow, Russia*

*e-mail: nata_gul@ihna.ru

Traumatic brain injury (TBI) in the long term is often accompanied by mental and neurological disorders. Glucocorticoids, which regulate the physiological response of the body to acute and chronic stress, may be associated with long-term changes in the hippocampus and long-term behavioral consequences of TBI. It is well known that the level of cortisol in humans and corticosterone (CS) in rats varies widely during the daily cycle and affects stress reactivity. We analyzed if the time of the day when lateral fluid percussion brain injury (LFP) has been applied affects the development of immediate posttraumatic seizures and CS level as a marker of stress-reactivity. Surgery and LFP application were carried out from 9:00 to 22:00. The animals were sacrificed on days 1, 3, 7 and 14 after TBI from 10:00 to 12:00, which corresponded to a low daily CS level in rats. For the first time we have shown that the time of LFP application is a significant factor affecting CS level elevation in the acute period of TBI: the earlier LFP was associated with the higher CS level in decapitation blood ($r = -0.56$, $p = 0.0004$). In addition, the duration of tonic seizures and the representation of tonic seizures and jumps were higher when LFP was applied in the morning hours compared with the evening hours. Thus, the time of TBI is an essential factor of GCs elevation after trauma and may affect the development of posttraumatic long-term consequences.

Keywords: traumatic brain injury, circadian rhythms, corticosterone, stress, convulsive seizures

МОДУЛЯЦИЯ СЕТЕВОЙ КОРТИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ДЫХАНИЕМ У ЮВЕНИЛЬНЫХ АНЕСТЕЗИРОВАННЫХ КРЫС

© 2022 г. В. В. Шумкова¹, В. Р. Ситдикова¹, В. М. Силаева¹,
Д. С. Сучков^{1, 2}, М. Г. Минлебаев^{1, 2, *}

¹НИЛ Нейробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
²Средиземноморский институт нейробиологии, университет Экс-Марсель, Марсель, Франция
*E-mail: minlebaevm@mail.ru

Поступила в редакцию 24.10.2022 г.

После доработки 09.11.2022 г.

Принята к публикации 10.11.2022 г.

Организованная нейронная активность лежит в основе функционирования головного мозга. Как обработка информации, так и ее передача между кортикальными структурами происходит за счет синхронизированной нейронной активности. В бодрствующем состоянии одним из механизмов, способствующих интеграции и синхронизации кортикальной активности между функционально связанными отделами центральной нервной системы, является сенсорный вход. Состояние глубокой анестезии или глубокого сна также характеризуется наличием организованной нейронной активности – медленными осцилляциями (МО). Однако находящаяся в этих состояниях центральная нервная система считается сенсорно депривированной. МО обладают высоким уровнем синхронизации между различными участками коры головного мозга, однако о механизмах, координирующих МО во время сна или анестезии, известно мало. Используя способы электрофизиологической регистрации активности неокортекса в модели *in vivo*, мы показали, что в состоянии глубокой анестезии МО в различных отделах неокортекса синхронизируются благодаря актам дыхания. Несмотря на разную частоту МО и дыхания, мы обнаружили фазовую привязку эпизодов кортикальной активности к дыханию. Наибольшая вероятность периодов кортикальной активности наблюдается во время фазы выдоха анестезированного животного, в то время как акт вдоха сопровождается снижением кортикальной активности. Полученные результаты показали, что дыхание играет роль водителя ритма кортикальной активности в то время, когда неокортекс ограничен в получении внешнего синхронизирующего стимула.

Ключевые слова: кортикальная активность, медленные осцилляции, внеклеточная регистрация, внутриклеточная регистрация, *in vivo*, крыса

DOI: 10.31857/S0869813922120123

Медленные осцилляции (МО) – сетевая нейронная активность в центральной нервной системе, характеризующаяся медленноволновыми колебаниями полевого потенциала. МО состоят из периодов нейронной активности – “периодов молчания и активности” (ПМА). Эпизоды активности (“Up” состояние) и ее отсутствия (“Down” состояние) чередуются с частотой около 1 Гц. Считается, что основным механизмом, лежащим в основе МО, является рекуррентное взаимодействие между нейронами коры головного мозга [1]. Но подкорковые структуры, в частности кортико-таламо-кортикальные нейронные взаимодействия, также могут вовле-

каться в генерацию МО. МО являются характерным признаком фазы глубокого сна, однако могут также наблюдаться в состояниях анестезии или травмы центральной нервной системы [1–5]. Предполагается, что в таких ситуациях неокортекс находится в состоянии относительной сенсорной депривации и занят обработкой информации и сигналов, генерируемых внутри самого мозга [3]. Было предположено, что функциональную ролью МО является создание условий для синхронизации активности нейрональных ансамблей, находящихся в различных участках неокортекса [6]. Однако для синхронизации нейронной активности в пространственно разделенных структурах неокортекса необходим общий механизм, обеспечивающий синхронизацию нейронной активности. Одним из возможных механизмов может являться наличие единого, общего источника активности, имеющего высокий уровень горизонтальных связей [7, 8]. В этом случае активность из этого участка латерально распространяется в соседние участки неокортекса, прогрессивно вовлекая весь неокортекс. Таким образом, должна наблюдаться нарастающая задержка в появлении организованной нейронной активности по мере удаления от источника. Другим потенциальным механизмом может быть сочетание единого глобального водителя ритма, синхронизирующего активность в локальных нейронных группах [9–11]. Однако наличие нейронных проекций, соединяющих “дирижера” с разными участками неокортекса, является необходимым условием для синхронизации неокортикальных нейронных ансамблей. На роль такого механизма, который может синхронизировать пространственно разделенные нейронные сети, было предложено дыхание. Корреляция кортикальной и субкортикальной активности с дыханием была продемонстрирована неоднократно [12–14]. В экспериментах на неанестезированных животных во время различных поведенческих состояний было обнаружено, что дыхание модулирует гиппокампальную активность и кортикальные переходы между периодами активности (ПА) и молчания (ПМ) в префронтальном неокортексе [13]. Похожие результаты были продемонстрированы в соматосенсорной коре бодрствующей мыши, где авторы показали, что дельта-волновая активность бочонковой части соматосенсорного неокортекса обладает фазовой привязкой к дыханию. Колебания полевого потенциала в гамма-диапазоне также были подвержены модуляции со стороны дыхательного ритма [14]. Однако мало что известно о том, оказывает ли дыхание модулирующее воздействие на кортикальную активность в соматосенсорной коре в то время, когда соматосенсорная система находится в состоянии сенсорной депривации. В настоящей работе была предпринята попытка ответить на этот вопрос, используя электрофизиологические регистрации в соматосенсорном неокортексе крысы, находящейся в состоянии глубокой анестезии. Полученные результаты показали, что кортикальная медленноволновая активность, характеризующая состояние фазы глубокого сна, является объектом модуляции со стороны дыхания. Наши результаты показали, что вероятность возникновения периода активности нейронов бочонковой коры возрастает во время акта выдоха, в то время как наибольшая вероятность периода молчания наблюдается во время вдоха животного. Обнаруженные результаты предполагают, что фазовая модуляция кортикальной активности дыханием является универсальным механизмом, наблюдаемым не только в префронтальной коре и субкортикальных структурах, как это было показано ранее, но и в соматосенсорной коре.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Этика работы с животными

Все экспериментальные протоколы с использованием животных создавались в соответствии с требованиями Казанского федерального университета по использо-

ванию лабораторных животных (разрешение этического комитета по заботе и помощи животным Казанского федерального университета, N9-2013). Эксперименты проводились в соответствии с Директивой Совета Евросоюза от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЕС).

Хирургия

Эксперименты проводились на крысах линии Wistar обоих полов в возрасте с P19 по P29 день (P0 день рождения животного). Хирургическое вмешательство на животном производилось в условиях анестезии с использованием газообразного анестезирующего вещества — изофлурана (Baxter, США) (5% для индукции и 1.5% во время хирургии). В ходе хирургии удалялась кожа над дорзальной поверхностью черепа. На очищенную и подсушенную поверхность кости наносился зубной цемент быстрой и холодной фиксации за исключением участка $5 \times 5 \text{ мм}^2$ над ожидаемым расположением неокортикального представительства соматосенсорной системы. Над этим участком закреплялась суперфузионная камера (патентная заявка № 2020140611 от 09.12.2020), дном которой являлась поверхность черепа. Далее животному внутрибрюшинно инъецировался анестетик — уретан (1.5 г/кг, Sigma-Aldrich, США) для последующей анестезии. Перед началом эксперимента животное фиксировалось в экспериментальной установке, где над областью с соматосенсорной корой в костях черепа вырезалось отверстие диаметром в 3.5–4 мм. Мозговые оболочки аккуратно убирались так, чтобы сосуды, питающие неокортекс, оставались неповрежденными. После этого поверхность неокортекса поджигалась перфорированной пластиной, чтобы убрать пульсации, связанные с дыханием и сердцебиением животного. Перфорации в прижимающей пластине были необходимы для последующей имплантации электродов. Для снижения уровня стресса и создания комфортных условий животное было обернуто ватой. Поддержание температуры осуществлялось с помощью термоковрика, расположенного под животным и поддерживающим постоянную температуру подогрева 35–37°C.

Регистрация внеклеточной активности

Регистрация кортикальной активности в соматосенсорной системе проводилась с помощью 16-ти канального электрода на кремниевой основе (шаг между регистрирующими площадками 100 мкм, производство Neuronex Technologies, США). Вертикальное расположение электродов позволяло проводить одновременную регистрацию кортикальной активности от разных слоев одной кортикальной колонки. Для оценки синхронности кортикальной активности в ряде экспериментов в неокортекс животного имплантировалось 2 многоканальных электрода (один из которых находился в соматосенсорной коре, а второй на расстоянии в 1.5–2 мм). В качестве референтного электрода использовалась хлорсеребряная проволока, расположенная в растворе, омывающем поверхность неокортекса. В ходе эксперимента проводилась регистрация колебаний локального полевого потенциала (ЛПП). Сигнал, зарегистрированный электродом, был усилен и отфильтрован ($\times 10000$; 0.15 Гц до 10 кГц) с помощью усилителя Digital Lynx SX (Neuralynx, США), запись производилась с частотой дискретизации 40 кГц.

Регистрация внутриклеточной активности

Для проведения внутриклеточной регистрации нейронной активности использовалась методика фиксации тока. Стекланные электроды из боросиликатного стекла (Sutter instrument, США) вытягивались на вертикальной кузнице (Narishige, Япония). Для регистрации использовались пипетки с сопротивлением 4–9 МОм.

Пипеточный раствор для регистрации в режиме фиксации тока содержал (мМ): 150 глюконата калия, 2 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 1 EGTA, 20 HEPES, pH 7.31 и имел осмолярность 295 мОсм/л. Средняя глубина регистрации составляла 200–800 мкм.

Регистрация дыхания

Дыхание регистрировалось с помощью пьезоэлектрического элемента, расположенного под грудной клеткой животного. Зарегистрированный сигнал был усилен и отфильтрован ($\times 10000$; 0.15 Гц до 10 кГц) с помощью усилителя Digital Lynx SX (Neuralynx, США), запись производилась с частотой дискретизации 40 кГц. Дополнительно была сделана серия экспериментов, где параллельно с регистрацией пьезодатчиком проводилась видеорегистрация (18 кадров/с) движений грудной клетки. Эти данные использовались для последующей оценки соответствия вдоха и выдоха.

Анализ данных

Анализ данных проводился с помощью функций, написанных в среде Matlab. Анализ выполнялся в несколько этапов. Первоначально детектировались внеклеточно зарегистрированные потенциалы действия – множественная нейронная активность (МНА). Все события, чья амплитуда превышала 5 стандартных отклонений, считались как МНА. После детекции МНА частота дискретизации исходного сигнала снижалась до 1000 Гц для уменьшения размера файлов с зарегистрированными данными.

Определение фаз дыхания

По данным с пьезодатчика детектировались начало и конец фаз вдоха и выдоха. Так как вдох и выдох характеризуются различными длительностями, для изучения модуляции активности мы прибегли к нормализации сигнала. Основываясь на амплитудных параметрах, цикл дыхания, состоящий из вдоха и выдоха, разбивался на 72 равные части. Таким образом, как вдох, так и выдох состояли из одинакового количества частей, несмотря на их различную продолжительность.

Детекция периодов активности и молчания

В контрольных условиях для детекции физиологического паттерна ПМА использовался модифицированный метод, описанный ранее [15]. Так как ПМА характеризуется частотой около 1 Гц, для исключения избыточных низко- и высокочастотных колебаний проводилась вейвлет-фильтрация сигнала в диапазоне 0.1–20 Гц. Для последующего определения порога строилась гистограмма распределения отфильтрованного сигнала, которая описывалась бимодальными характеристиками. Алгоритм максимизации ожидания был использован для подбора этого распределения смесью двух распределений Гаусса со средними значениями μ и σ . Периоды времени, когда отфильтрованный потенциал был выше $\mu - (1-3)\sigma$, считались кортикальными состояниями ПА, а ниже $\mu + (1-3)\sigma$ – кортикальными состояниями ПМ. При этом порог в 1σ использовался в случае, если во время ПА наблюдались высокоамплитудные осцилляции, а 3σ в остальных случаях. Далее проводилась коррекция границ ПМ и ПА по задетектированным временным меткам МНА. Окончательно за ПМ считались эпизоды ниже порога, и во время которых отсутствовала МНА. За ПА считались эпизоды выше порога и сопровождающиеся МНА.

Таблица 1. Отношение площадей периодов активности, молчания и множественной нейронной активности во время вдоха и выдоха

	Медиана	25%	75%
ПМ	0.94	0.91	0.96
ПА	1.10	1.04	1.16
МНА	1.11	1.08	1.21

Статистическая обработка

Достоверность изменений считалась с помощью парного *t*-теста Стьюдента с уровнем значимости $p < 0.05$. Для описания групповых результатов использовались диаграммы размаха (boxplot) с центральной отметкой, указывающей на медиану, и нижним и верхним краями прямоугольника, указывающими на 25-й и 75-й процентиля соответственно. Степень дисперсии обозначалась исходящими из прямоугольника пунктирными линиями, которые простирались до самых крайних точек данных, не считающихся выбросами, и выбросы строились индивидуально с использованием символа “+”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кортикальная активность модулируется дыханием во время медленноволнового сна

В настоящее время зависимость кортикальной активности от дыхания уже неоднократно была продемонстрирована у бодрствующих животных, однако до сих пор мало известно о модуляторной роли дыхания в кортикальную активность в то время, когда неокортекс находится в состоянии сенсорной депривации. Чтобы ответить на этот вопрос, мы провели серию экспериментов с одновременной регистрацией дыхательных движений и кортикальной активности в соматосенсорной коре анестезированной крысы. В ходе регистрации мы наблюдали медленноволновые колебания локального полевого потенциала, имеющие низкую частоту – медленные осцилляции (рис. 1a). МО являются характерным маркером глубокого сна и состоят из периодов молчания и периодов нейронной активности. Во время пика ПА также наблюдались всплески МНА. Чтобы избежать влияния различной длительности фаз на модуляцию кортикальной активности, была проведена нормализация. При этом сигнал с пьезодатчика разбивался на 72 равных по амплитуде интервала, что соответствовало 180 градусам на вдох и столько же на выдох (см. Методы исследования). Анализ привязки активности к фазам дыхания показал, что наибольшая вероятность ПМ наблюдается на вдохе, при этом ПА более привязаны к выдоху. Дополнительно оценивалась привязка МНА, которая также преобладала во время выдоха (рис. 1b). Групповая статистика показала, что соотношение площади ПМ во время выдоха и вдоха меньше 1 (медиана 0.94) для всех животных ($n = 10$ животных, $p < 0.01$, рис. 1c, табл. 1), то есть ПМ чаще наблюдались во время выдоха. Подобный анализ для ПА показал, что такое соотношение больше 1 (медиана 1.1), таким образом, периоды активности чаще наблюдались во время выдоха. Подобные результаты также показала оценка соотношения МНА во время вдоха и выдоха (медиана составила 1.11). Таким образом, МО модулируются дыханием, при этом ПА коррелируют с фазой выдоха.

Пьезосигнал позволяет отследить дыхательные движения животного

Чтобы оценить используемый нами способ регистрации фаз дыхания с помощью пьезодатчика, мы провели параллельную пьезо- и видеорегистрацию дыха-

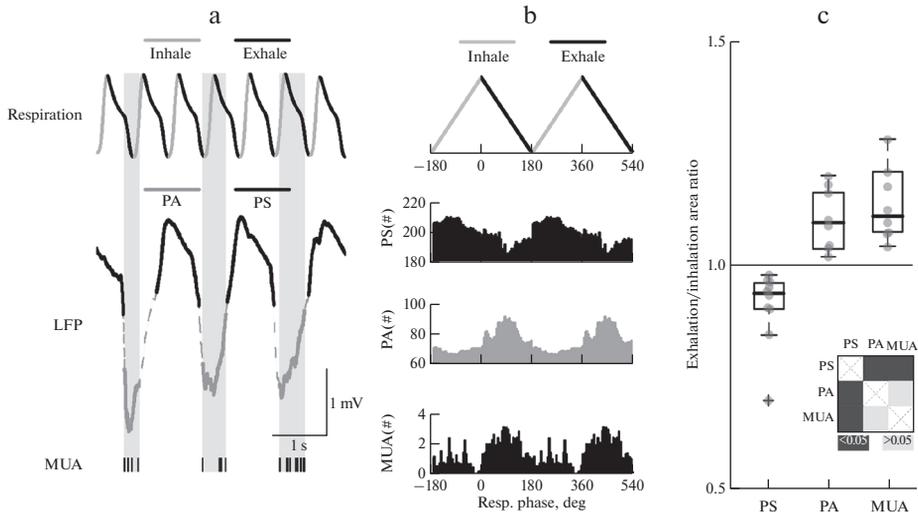


Рис. 1. Модуляция медленных осцилляций, зарегистрированных во время глубокой анестезии, дыханием. (а) – пример одновременной регистрации дыхания (верхний график), колебаний локального полевого потенциала (LFP, средний график) с мультинейронной активностью (MUA, нижний график) в неокортексе крысы *in vivo*. Цветовой код периода вдоха – серый, выдоха – черный. Отдетектированные периоды активности показаны вертикальными прямоугольниками. (б) – гистограммы распределения периодов молчания (PS, второй сверху график), периодов активности (PA, третий сверху график) и множественной нейронной активности (MUA, нижний график) по отношению к нормализованным циклам дыхания (цветовой код периода вдоха – серый, выдоха – черный). (с) – результаты групповой статистики по привязке периодов молчания (PS), периодов активности (PA) и множественной нейронной активности (MUA) к фазам дыхания (вдох, выдох). Значения ниже 1 соответствуют доминирующей представленности во время вдоха, значения выше 1 соответствуют доминирующей представленности во время выдоха. Средняя линия диаграммы размаха отражает медиану, верхние и нижние контуры соответствуют нижнему и верхнему квартилю, а усы характеризуют минимальное и максимальное значение выборки. Серые круги соответствуют результатам отдельных экспериментов ($n = 10$). Результаты статистических тестов представлены в виде карты достоверностей, где значения p показано цветом.

тельных движений животного (рис. 2а). Полученные результаты показали, что изменение объема грудной клетки во время актов дыхания имело высокую степень схожести с изменениями, наблюдаемыми на пьезосигнале. Расширение грудной клетки (вдох) сопровождалось положительным отклонением пьезосигнала. Сужение грудной клетки во время выдоха отражалось возвращением пьезосигнала к базовой линии (рис. 2а, б). Результаты кросскорреляционного анализа показали высокий коэффициент корреляции с видеоданными и отсутствие временного сдвига между пьезо- и видеосигналом (коэффициент корреляции составлял 0.83 (25% – 0.69 и 75% – 0.85), $n = 3$ животных) (рис. 2с). Таким образом, пьезодатчик может использоваться как простой метод мониторинга дыхания животного.

Синхронность медленных осцилляций в разных участках неокортекса

Чтобы оценить синхронность кортикальной активности в разных участках неокортекса, мы провели одновременную регистрацию электрофизиологической активности с использованием 2 внеклеточных электродов. Один из электродов рас-

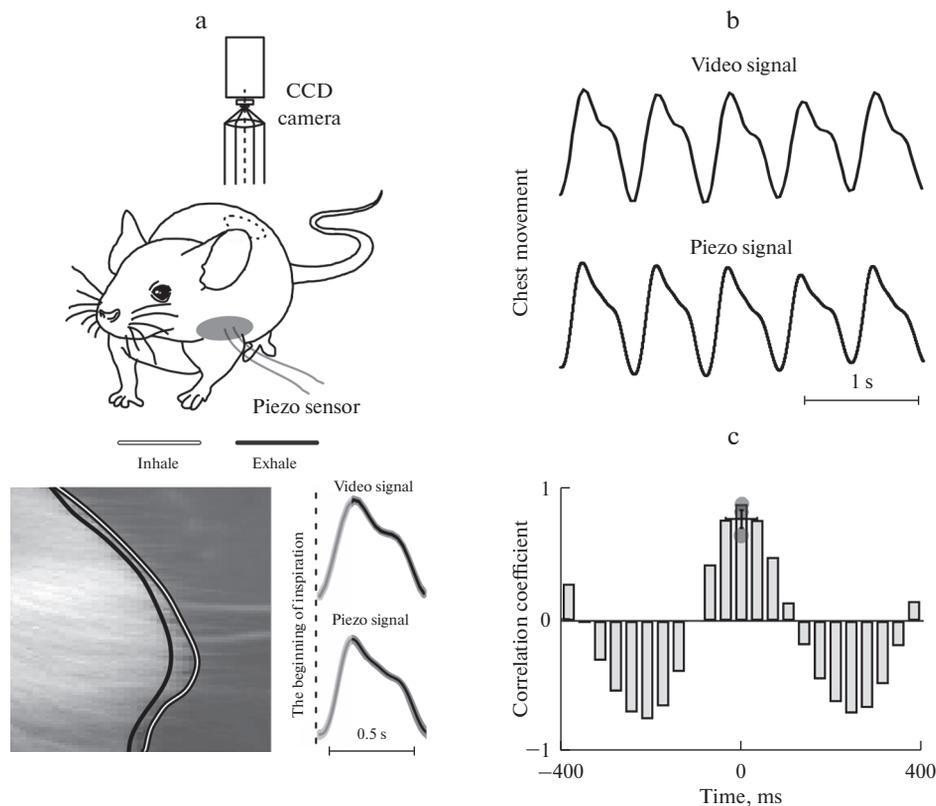


Рис. 2. Мониторинг дыхания с помощью пьезосигнала. (а) — экспериментальная схема параллельной видеорегистрации движений грудной клетки и пьезосигнала показана сверху. Пример видеоизображения границы грудной клетки на выдохе (черная линия) и вдохе (белая линия с окантовкой) показаны ниже слева. Усредненный дыхательный цикл, отдетектированный по видео- и пьезосигналам показан ниже справа. Цветовой код периода вдоха — серый и выдоха — черный. (б) — примеры результатов анализа изменений объема грудной клетки, зарегистрированного с помощью видео- (верхний график) и пьезорегистрации. (с) — результат анализа корреляции пьезо- и видеосигналов для одного эксперимента. Кругами показаны результаты отдельных экспериментов ($n = 3$ животных).

полагался в соматосенсорном неокортексе, а второй находился на расстоянии 1–1.5 мм в рострально-медиальном направлении. Нахождение электрода “1” в бочонковом отделе соматосенсорного неокортекса подтверждалось наличием вызванного ответа на стимуляцию вибриссы (рис. 3а). Отсутствие вызванного ответа на записях электрода “2” подтверждало то, что он находился за пределами бочонкового отдела соматосенсорного неокортекса. Несмотря на то, что электроды находились в функционально не связанных отделах неокортекса, на обеих регистрациях наблюдались медленноволновые колебания (рис. 3б). Наряду с этим, спонтанные МО на двух электродах характеризовались высокой степенью схожести и отсутствием временных задержек, что подтверждается результатами корреляционного анализа. Медианное значение по групповой статистике коэффициентов корреляции составляет 0.93 (25% – 0.93 и 75% – 0.95) ($n = 5$ животных, рис. 3с). Таким образом, МО синхронны в различных отделах неокортекса.

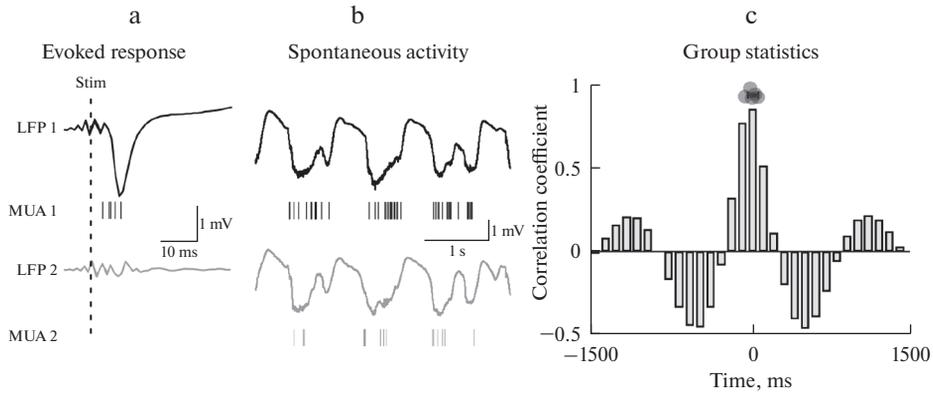


Рис. 3. Внеклеточная регистрация организованной нейронной активности в различных отделах неокортекса. (а) — кортикальный ответ на стимуляцию чувствительных вибрисс, зарегистрированный двумя внеклеточными электродами, находящимися на расстоянии 1–1.5 мм друг от друга. Наличие вызванного ответа на электроде “1” (LFP1) подтверждает его расположение в бочонковом отделе соматосенсорного неокортекса. (б) — спонтанные медленноволновые осцилляции, зарегистрированные двумя электродами, находящимися на расстоянии 1–1.5 мм друг от друга. (с) — гистограмма, отражающая результат корреляционного анализа медленноволновых осцилляций, зарегистрированных в 2 различных отделах неокортекса для одного эксперимента. Кружками показаны пиковые значения коэффициентов корреляции внеклеточной активности для разных экспериментов ($n = 5$ экспериментов).

Организованная активность одиночных нейронов во время медленноволновых осцилляций

В предыдущем разделе мы продемонстрировали модуляцию МО дыханием и охарактеризовали колебания локального полевого потенциала в разных участках неокортекса. Однако флюктуации локального полевого потенциала являются результатом интегральной активности множества клеток. Чтобы оценить активность отдельных нейронов во время медленноволновых событий, мы провели серию регистраций активности отдельных нейронов с использованием техники фиксации потенциала в конфигурации “целой клетки” совместно с внеклеточной регистрацией (рис. 4а). Мы наблюдали, что колебания мембранного потенциала отдельных нейронов и полевого потенциала характеризуются синхронной медленноволновой активностью. Направления колебаний МО были противоположными, что связано с разным типом регистрации (внутри- и внеклеточной). Результаты корреляционного анализа подтвердили наше наблюдение (медианный коэффициент корреляции колебаний мембранного потенциала и полевого потенциала составил 0.61 (25% – 0.55 и 75% – 0.77, $n = 5$ животных, рис. 4б). Во время ПА мембранный потенциал нейрона деполяризовывался до -45.80 мВ, а во время ПМ наблюдалась его реполяризация до -53.25 мВ ($n = 5$ клеток, $n = 5$ животных, рис. 4с, табл. 2). Во время ПА деполяризованное состояние регистрируемых нейронов сопровождалось спайкованием клетки (1.44 ПД на каждый ПА, $n = 5$ клеток, $n = 5$ животных, рис. 4д), в то время как во время ПМ и реполяризации клетки спайки отсутствовали. Отсутствие разрядов нейронов во время ПМ также характеризовало множественную нейронную активность, когда в период активности уровень внеклеточно зарегистрированных потенциалов действия достигал 11.9 потенциалов действия/ПА, наблюдаемых с частотой в 28 Гц ($n = 10$ животных, рис. 4е, табл. 2). Таким образом, активность отдельных нейронов повторяет общее поведение неокортекса во время МО.

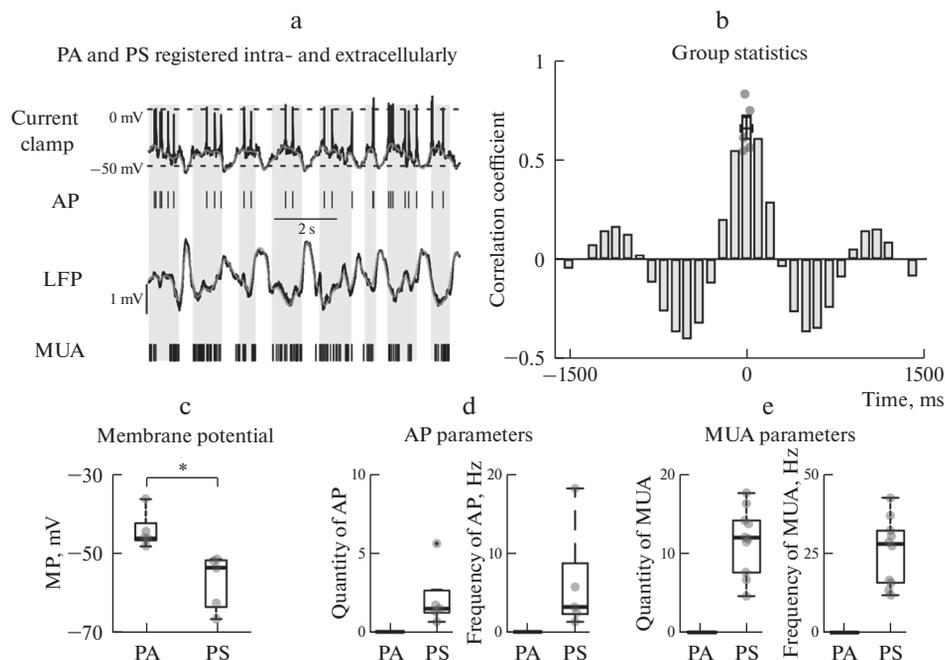


Рис. 4. Корреляция внеклеточной и внутриклеточной нейронной активности во время медленноволновых осцилляций. (а) — пример одновременной внеклеточной и внутриклеточной (в режиме фиксации тока) регистрации нейронной активности. Верхний график соответствует внутриклеточной регистрации, ниже, вертикальные черточки — отдетектированные потенциалы действия (AP на рисунке), график ниже — колебания локального полевого потенциала (LFP) и нижние вертикальные черточки — внеклеточно зарегистрированные потенциалы действия (множественная нейронная активность, MUA). (б) — гистограмма, отражающая результат корреляционного анализа внутриклеточной и внеклеточной регистраций для разных экспериментов ($n = 5$ экспериментов). (с, d, e) — результаты групповой статистики мембранного потенциала, количества и частоты потенциалов действия (AP) и множественной нейронной активности (MUA) во время периодов молчания (PS) и активности (PA) соответственно. Средняя линия отражает медиану, верхние и нижние контуры “коробки” соответствуют нижнему и верхнему квартилю, а усы характеризуют минимальное и максимальное значение выборки. Серые круги соответствуют результатам отдельных экспериментов.

Таблица 2. Поведение отдельных и множества нейронов во время медленноволновой активности

	Медиана		25%		75%	
	ПА	ПМ	ПА	ПМ	ПА	ПМ
Мембранный потенциал, мВ	-45.80	-53.25	-46.34	-63.08	-41.95	-51.3
Количество ПД	1.44	0	1.14	0	2.6	0
Частота ПД, Гц	3.16	0	2.15	0	8.82	0
Количество МНА	11.90	0	7.54	0	14.03	0
Частота МНА, Гц	28.00	0	15.80	0	32.30	0

Таблица 3. Частотные и временные характеристики дыхания и медленноволновых осцилляций

Параметр	Медиана	25%	75%
Частота дыхания, Гц	1.60	1.52	1.69
Частота ПМА, Гц	0.63	0.56	0.74
Длительность вдоха, мс	144.99	133.73	151.72
Длительность выдоха, мс	374.41	355.59	404.01
Отношение длительностей выдох/вдох	2.56	2.43	2.73
Длительность ПА, мс	504.39	440.35	544.20
Длительность ПМ, мс	454.25	360.67	568.60
Отношение длительностей ПМ/ПА	0.96	0.58	1.26

Частотные и временные характеристики дыхания и медленноволновых осцилляций

Частота МО крайне вариабельна и зависит от ряда факторов, одним из которых является глубина анестезии [16]. В ряде случаев частота МО может совпадать или мало отличаться от частоты дыхания, что может привести к ошибочной интерпретации результатов. Если дыхание и МО находятся в одном частотном диапазоне, то анализ причинно-следственных связей позволяет ответить на вопрос о том, насколько они зависят друг от друга. Для того, чтобы оценить необходимость проведения анализа причинно-следственных связей мы проанализировали частотные и временные характеристики дыхания и медленноволновой активности. Несмотря на то, что дыхание модулирует кортикальную активность, мы наблюдали достоверное различие в частотных характеристиках дыхательных движений и кортикальной активности (рис. 5a–d). Медианная частота дыхания составляла 1.60 Гц, медианная частота ПМА 0.63 Гц ($p < 0.01$, $n = 10$ животных, рис. 5d, табл. 3). Значительное различие в частоте дыхания и МО позволяет исключить возможность их случайного фазового совпадения. Мы также провели оценку временных параметров дыхания (рис. 5e). Медианная длительность вдоха 144.99 мс, длительность выдоха 374.41 мс ($n = 10$ животных, рис. 5e, табл. 3). Длительность выдоха в 2–3 раза превышает длительность вдоха, отношение длительностей выдох/вдох составляет 2.56. Оценка параметров МО показала, что медиана длительностей ПМ и ПА достоверно не отличается, $p > 0.05$ (рис. 5f). При этом медианная длительность ПМ составляла 454.25 мс, а длительность ПА была 504.39 мс ($n = 10$ животных, рис. 5f, табл. 3). Отношение длительностей ПМ/ПА составляет 0.96.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используя электрофизиологические подходы в модели *in vivo*, мы показали, что кортикальная активность модулируется дыханием, это подтверждается результатами других исследовательских групп. Однако в нашей работе мы продемонстрировали, что кортикальная активность модулируется дыханием во время глубокой анестезии животного, то есть в тот период, когда неокортекс находится в сенсорно депривированном состоянии. На этом основании, мы предполагаем, что модуляция кортикальной активности происходит без вовлечения сенсорной компоненты соматосенсорной системы. Мы также идентифицировали и описывали характеристики медленноволновой активности, а именно ПА и ПМ и их привязку к актам дыхания. Наши результаты показывают, что наибольшая вероятность “периода активности” наблюдается во время акта выдоха животного.

Наша работа не является первой, где демонстрируется модуляторная роль дыхания в кортикальной активности. Однако большинство опубликованных результа-

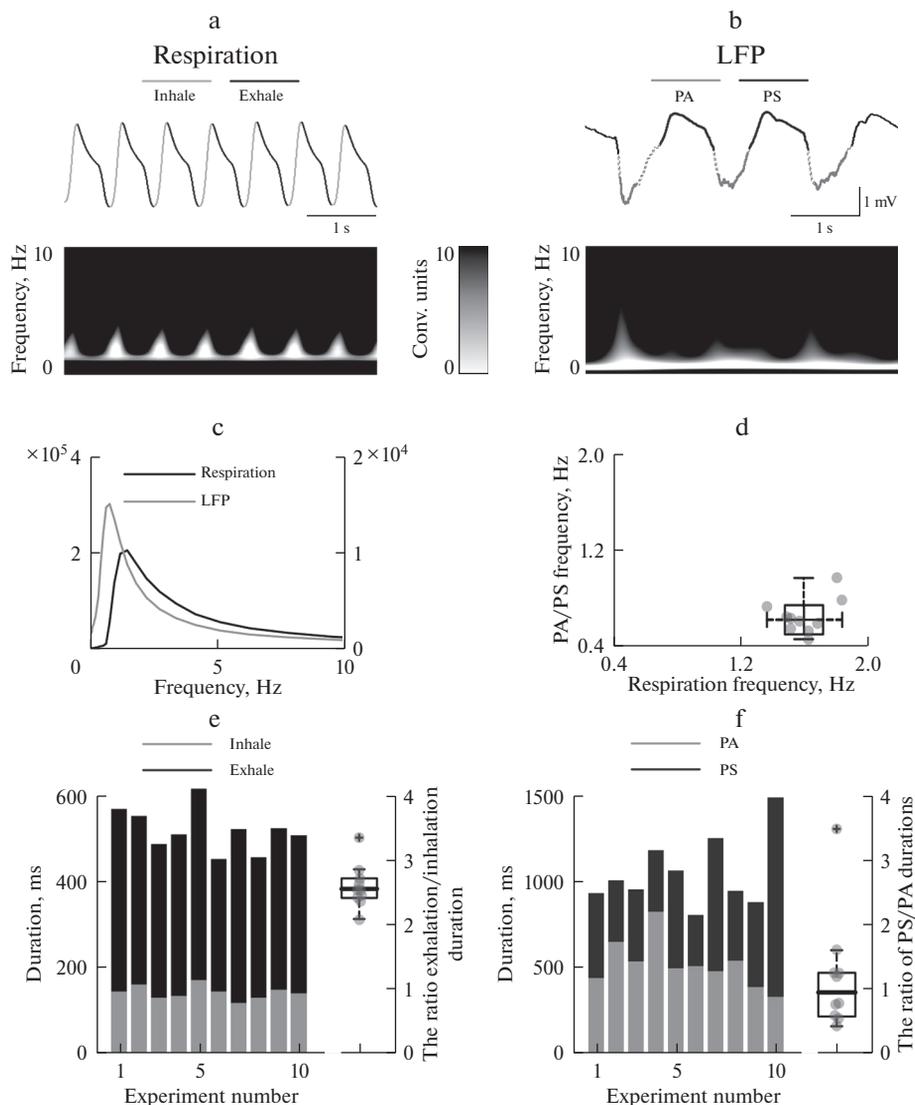


Рис. 5. Частотные и временные характеристики дыхания и медленноволновых осцилляций. (a) – пример регистрации дыхательных движений (верхний график) с соответствующим ему непрерывным временно-частотным анализом (нижняя картинка). Цветом закодированы фазы вдоха и выдоха (светло- и темно-серый цвета соответственно). (b) – пример регистрации МО (верхний график) с соответствующим ему непрерывным временно-частотным анализом (нижняя картинка). Цветом закодированы фазы вдоха и выдоха (светло- и темно-серый цвета соответственно). (c) – результаты частотного анализа на основе преобразования Фурье для эксперимента, показанного на а, b. (d) – результаты групповой статистики частот дыхания и МО, где средняя линия отражает медиану, верхние и нижние, правые и левые контуры “коробки” соответствуют нижнему и верхнему квартилю, а усы характеризуют минимальное и максимальное значение выборки. Серые круги соответствуют результатам отдельных экспериментов. Необходимо отметить, что частота дыхания выше, чем частота МО во всех экспериментах. (e) – временные параметры цикла дыхания для каждого эксперимента, где длительности вдоха и выдоха закодированы цветом. Результаты групповой статистики продемонстрированы справа от результатов индивидуальных экспериментов. (f) – временные параметры цикла периодов активности и молчания для каждого эксперимента, где длительности периодов активности и молчания закодированы цветом. Результаты групповой статистики продемонстрированы справа от результатов индивидуальных экспериментов.

тов были получены у бодрствующих животных. В состоянии бодрствования кортикальная активность принципиально отличается от активности у спящего или анестезированного животного. Бодрствующий мозг находится в постоянной активности. Флуктуации интегральной нейронной активности образуют высокоструктурированные паттерны – осцилляции в различных частотных диапазонах [17, 18], которые влияют как на вызванную активность, так и на сенсорное восприятие [19–22]. Эти ритмы активности могут модулироваться, в частности дыханием. Так, регистрируя локальный полевой потенциал в бочонковой коре бодрствующей мыши, Ito и соавт. [14] показали, что осцилляторная кортикальная активность в дельта-диапазоне (0.5–4 Гц) коррелирует с частотой дыхания (1–3 Гц). Авторы обнаружили, что колебания ЛПП в гамма-частотном диапазоне также модулированы фазами дыхания. Так как регистрации проводились в соматосенсорном неокортексе, а гамма-активность связана с сенсорным входом [23, 24], можно предположить, что модуляция кортикальной активности дыханием связана со стимуляцией периферических сенсорных входов током воздуха, проходящего через дыхательные пути. Основанием для этого является то, что обонятельные чувствительные нейроны у млекопитающих также являются механочувствительными [25], то есть изменение давления в носовых проходах во время дыхания может приводить к их активации. Однако авторы показали, что механизм модуляции кортикальной активности связан именно с активностью в обонятельной системе. Хирургическое иссечение обонятельных луковиц приводило к исчезновению медленноволновой активности в соматосенсорной коре. Кроме этого, прямая электрическая стимуляция обонятельных луковиц сопровождалась высококоррелированными колебаниями полевого потенциала. Авторы продемонстрировали, что синхронизация медленноволновой активности дыхательными движениями не вовлекает активацию периферических сенсорных входов, что также подтверждает наши результаты и выводы. Одним из механизмов регуляции кортикальной активности может быть вовлечение субкортикальных структур. Необходимым условием для этого является наличие обширной сети проекций в неокортексе. Потенциальным кандидатом на роль “дирижера” кортикальных МО может выступать таламус. Наличие анатомического субстрата для синхронизации медленноволновой активности таламусом во время сна ранее уже было продемонстрировано [1]. Необходимо уточнить, что таламус в этом случае не выступает генератором активности, а обеспечивает синхронизацию нейронной активности, возникшей в разных участках неокортекса. Наличие кортикальных нейронных ансамблей, способных к генерации сетевой активности, ранее уже было продемонстрировано [3, 26]. Но механизм синхронизации кортикальной активности таламусом может быть не единственным механизмом. Демонстрированная модуляция кортикальной активности в ответ на электрическую стимуляцию обонятельных луковиц [14] может являться результатом горизонтального проведения через нейронные связи неокортекса. Эта гипотеза подтверждается результатами морфологических исследований с использованием ретроградных клеточных маркеров [14, 27]. Инъекцированный в бочонковую кору ретроградно распространяющийся маркерный краситель был обнаружен в нейронах не только таламических релейных ядер (вентрозаднемедиальное и вентрозаднелатеральное), но и в контралатеральном бочонковом, вторичном соматосенсорном, энторинальном и двигательном неокортексе. Таким образом, модуляция одной из этих структур дыханием может быть достаточным условием для общей синхронизации как вышеперечисленных структур, так и соматосенсорного неокортекса. Это предположение подтверждается результатами регистрации активности в разных структурах у спящего животного [13]. Используя внеклеточную регистрацию кортикальной активности в сочетании с фармакологическими манипуляциями, авторы показали дыхательную модуляцию сетевой нейронной активности в гиппокампе, таламусе,

амигдале и зрительной коре у бодрствующего животного. Но в этой работе также продемонстрировано, что ПА и ПМ, наблюдаемые у спящего животного в префронтальном неокортексе, модулируются со стороны дыхания. Однако в отличие от работы Ito с соавт. [14] фармакологическая десенситизация обонятельной системы не привела к исчезновению модуляторного влияния дыхания на кортикальную активность. Авторы объяснили это наличием восходящих и расходящихся нейронных проекций из дыхательного центра, точнее из его вентральной респираторной группы (пре-Бётцингеровского комплекса), которые модулируют кортикальную активность. Наши данные впервые показывают, что сетевая активность соматосенсорного кортекса координируется дыханием в состоянии сенсорной депривации центральной нервной системы. Представленные данные свидетельствуют о том, что дыхание обеспечивает постоянный поток ритмических сигналов в мозг, вне зависимости от состояния центральной нервной системы. Возможно, что такая координация является необходимым условием для функциональной интеграции локальных нейронных ансамблей в общекортикальную активность в отсутствие сенсорных входов. Для проверки этой гипотезы потребуются дальнейшие исследования по тщательному изучению временных параметров нейронной активности разных структур центральной нервной системы и дыхательного ритма. Описанные нами свойства МО и их зависимость от дыхательных ритмов могут объяснять роль дыхания в духовной и реабилитационной практике и при эмоциональных нарушениях [28–30].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00225.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М.Г.М.), сбор данных (В.В.Ш., В.Р.С., В.М.С.), обработка данных (В.В.Ш., В.Р.С.), написание и редактирование манускрипта (М.Г.М., В.В.Ш., В.Р.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262(5134): 679–685.
<https://doi.org/10.1126/science.8235588>
2. Riedner BA, Vyazovskiy V, Huber R, Massimini M, Esser S, Murphy M, Tononi G (2007) Sleep homeostasis and cortical synchronization: III. A high-density EEG study of sleep slow waves in humans. *Sleep* 30: 1643–1657.
<https://doi.org/10.1093/sleep/30.12.1643>
3. Steriade M, Timofeev I, Grenier F (2001) Natural waking and sleep states: A view from inside neocortical neurons. *J Neurophysiol* 85: 969–1985.
<https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.5.1969>
4. Chauvette S, Crochet S, Volgushev M, Timofeev I (2011) Properties of slow oscillation during slow-wave sleep and anesthesia in cats. *J Neurosci* 31: 14998–15008.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2339-11.2011>
5. Andersen P, Andersson SA, Lomo T (1968) Thalamo-cortical relations during spontaneous barbiturate spindles. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 24(1): 90.
6. Sirota A, Buzsáki G (2005) Interaction between neocortical and hippocampal networks via slow oscillations. *Thalamus Relat Syst* 3: 245–259.
<https://doi.org/10.1017/S1472928807000258>

7. *Sanchez-Vives MV, McCormick DA* (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3: 1027–1034.
<https://doi.org/10.1038/79848>
8. *Cossart R, Aronov D, Yuste R* (2003) Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423: 283–288.
<https://doi.org/10.1038/NATURE01614>
9. *Kumar A, Rotter S, Aertsen A* (2010) Spiking activity propagation in neuronal networks: Reconciling different perspectives on neural coding. *Nat Rev Neurosci* 11: 615–627.
10. *Fischer I, Vicente R, Buldú JM, Peil M, Mirasso CR, Torrent MC, García-Ojalvo J* (2006) Zero-lag long-range synchronization via dynamical relaying. *Phys Rev Lett* 97(12): 123902.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.123902>
11. *Buzsáki G, Logothetis N, Singer W* (2013) Scaling brain size, keeping timing: Evolutionary preservation of brain rhythms. *Neuron* 80: 751–764.
12. *Biskamp J, Bartos M, Sauer JF* (2017) Organization of prefrontal network activity by respiration-related oscillations. *Sci Rep* 7: 45508.
<https://doi.org/10.1038/srep45508>
13. *Karalis N, Sirota A* (2022) Breathing coordinates cortico-hippocampal dynamics in mice during offline states. *Nat Commun* 13(1): 467.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28090-5>
14. *Ito J, Roy S, Liu Y, Cao Y, Fletcher M, Lu L, Boughter JD, Grün S, Heck DH* (2014) Whisker barrel cortex delta oscillations and gamma power in the awake mouse are linked to respiration. *Nat Commun* 5: 3572.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4572>
15. *Saleem AB, Chadderton P, Apergis-Schoute J, Harris KD, Schultz SR* (2010) Methods for predicting cortical UP and DOWN states from the phase of deep layer local field potentials. *J Computat Neurosci* 29(1–2): 49–62.
<https://doi.org/10.1007/s10827-010-0228-5>
16. *Torao-Angosto M, Manasanch A, Mattia M, Sanchez-Vives M* (2021) Up and Down States During Slow Oscillations in Slow-Wave Sleep and Different Levels of Anesthesia. *Front Syst Neurosci* 15: 5.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.609645>
17. *Arieli A, Sterkin A, Grinvald A, Aertsen A* (1996) Dynamics of ongoing activity: Explanation of the large variability in evoked cortical responses. *Science* 273: 1868–1871.
<https://doi.org/10.1126/science.273.5283.1868>
18. *Poulet JFA, Petersen CCH* (2008) Internal brain state regulates membrane potential synchrony in barrel cortex of behaving mice. *Nature* 454: 881–885.
<https://doi.org/10.1038/nature07150>
19. *Linkenkaer-Hansen K, Nikulin VV, Palva JM, Kaila K, Ilmoniemi RJ* (2004) Stimulus-induced change in long-range temporal correlations and scaling behaviour of sensorimotor oscillations. *Eur J Neurosci* 19: 203–218.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03116.x>
20. *Boly M, Baeteau E, Schnakers C, Degueldre C, Moonen G, Luxen A, Phillips C, Peigneux P, Maquet P, Laureys S* (2007) Baseline brain activity fluctuations predict somatosensory perception in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12187–12192.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611404104>
21. *Sadaghiani S, Hesselmann G, Kleinschmidt A* (2009) Distributed and antagonistic contributions of ongoing activity fluctuations to auditory stimulus detection. *J Neurosci* 29: 13410–13417.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2592-09.2009>
22. *Palva JM, Zhigalov A, Hirvonen J, Korhonen O, Linkenkaer-Hansen K, Palva S* (2013) Neuronal long-range temporal correlations and avalanche dynamics are correlated with behavioral scaling laws. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 3585–3590.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1216855110>
23. *Gray CM, König P, Engel AK, Singer W* (1989) Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature* 338: 334–337.
<https://doi.org/10.1038/338334a0>
24. *Lachaux JP, George N, Tallon-Baudry C, Martinerie J, Hugueville L, Minotti L, Kahane P, Renault B* (2005) The many faces of the gamma band response to complex visual stimuli. *Neuroimage* 25: 491–501.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.11.052>
25. *Grosmaître X, Santarelli LC, Tan J, Luo M, Ma M* (2007) Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nat Neurosci* 10: 348–354.
<https://doi.org/10.1038/nn1856>
26. *Luczak A, Barthó P, Marguet SL, Buzsáki G, Harris KD* (2007) Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 347–352.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605643104>

27. *Brown CE, Dyck RH* (2005) Retrograde tracing of the subset of afferent connections in mouse barrel cortex provided by zincergic neurons. *J Compar Neurol* 486: 48–60.
<https://doi.org/10.1002/cne.20522>
28. *Brown RP, Gerbarg PL* (2005) Sudarshan Kriya Yogic breathing in the treatment of stress, anxiety, and depression: Part II - Clinical applications and guidelines. *J Alternat Complement Med* 11: 711–717.
29. *Kunik ME, Roundy K, Veazey C, Soucek J, Richardson P, Wray NP, Stanley MA* (2005) Surprisingly high prevalence of anxiety and depression in chronic breathing disorders. *Chest* 127:1205–1211.
<https://doi.org/10.1378/chest.127.4.1205>
30. *Gold AR* (2011) Functional somatic syndromes, anxiety disorders and the upper airway: A matter of paradigms. *Sleep Med Rev* 15: 389–401.

Cortical Network Activity Modulation by Breath in the Anesthetized Juvenile Rats

V. V. Shumkova^a, V. R. Sitdikova^a, V. M. Silaeva^a,
D. S. Suchkov^{a, b}, and M. G. Minlebaev^{a, b, *}

^a*Kazan Federal University, Kazan, Russia*

^b*Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Aix-Marseille University, Marseille, France*

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

Organized neuronal activity underlies brain functioning. Both information processing and transmission between cortical structures occur due to synchronized neuronal activity. In the awake state, one of the mechanisms contributing to integration and synchronization of cortical activity between functionally linked parts of the central nervous system is sensory input. The state of deep anesthesia or deep sleep is also characterized by the presence of organized neural activity – slow oscillations (SO). However, under these states, the central nervous system is considered to be sensory deprived. While SOs have a high level of synchronization between different cortical areas, little is known about the mechanisms that coordinate MOs during sleep or anesthesia. Using methods of electrophysiological recording of neocortex activity in a *in vivo* model, we show that during deep anesthesia, SOs in different parts of the neocortex are synchronized by breathing. Despite the different frequencies of SOs and breathing, we found a phase-lock of episodes of cortical activity to breathing. The highest probability of periods of cortical activity is observed during the exhalation phase of the anesthetized animal, while the inhalation is accompanied by a decrease in cortical activity. Our results, show that breath plays the role of a driver of the rhythm of cortical activity at a time when the neocortex is restricted in receive of an external synchronizing stimulus.

Keywords: cortical activity, slow wave oscillations, extracellular recordings, intracellular recordings, *in vivo*, rat

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**МИКРОЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ ЛАТЕРАЛЬНОЙ ОРБИТАЛЬНОЙ КОРЫ
КРЫСЫ ВЫЗЫВАЕТ СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ СИСТЕМ
КРОВООБРАЩЕНИЯ И ДЫХАНИЯ**

© 2022 г. Т. Н. Кокурина¹, Е. А. Губаревич¹, Г. И. Рыбакова¹,
Т. С. Туманова^{1,2}, В. Г. Александров^{1,*}

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

²*Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: aleksandrov@infran.ru

Поступила в редакцию 30.09.2022 г.

После доработки 05.11.2022 г.

Принята к публикации 10.11.2022 г.

К настоящему времени установлено, что области т.н. “автономной” префронтальной коры, расположенные на медиальной и латеральной поверхностях больших полушарий, входят в состав центральной автономной сети и принимают участие в контроле функций дыхания и кровообращения. Результаты морфологических исследований указывают на то, что области коры на орбитальной и фронтальной поверхностях полушария образуют прямые связи с автономной корой и другими структурами центральной автономной сети. Эти данные позволяют предположить участие орбитофронтальной коры в контроле автономных функций. Целью настоящего исследования стала экспериментальная проверка гипотезы о возможном участии латеральной орбитальной области коры в контроле функций дыхания и кровообращения. С этой целью в острых экспериментах на крысах, анестезированных уретаном, были зарегистрированы реакции систем кровообращения и дыхания на локальную микроэлектростимуляцию латеральной орбитальной и медиальной префронтальной (инфраламбической) коры сериями прямоугольных импульсов тока. Эксперименты показали, что стимуляция каждой из указанных областей коры одного и того же экспериментального животного вызывала специфические реакции системы дыхания, которые проявлялись в характерных изменениях объемно-временных параметров внешнего дыхания. Система кровообращения реагировала на стимуляцию исследованных областей коры постепенным снижением артериального давления на фоне продолжающейся стимуляции, причем депрессорные ответы на стимуляцию инфраламбической и латеральной орбитальной коры отличались по амплитуде и временному течению. Таким образом, было установлено, что микроэлектростимуляция латеральной орбитальной коры анестезированной крысы вызывает специфические реакции систем дыхания и кровообращения. Полученные результаты подтвердили гипотезу о возможном участии латеральной орбитальной коры в контроле функций дыхания и кровообращения. Возможно, что латеральная орбитальная кора реализует свое влияние на функции дыхания и кровообращения путем взаимодействия с висцеромоторной инфраламбической корой, однако это предположение требует экспериментальной проверки.

Ключевые слова: орбитофронтальная кора, инфраламбическая кора, центральная автономная сеть, дыхание, кровообращение, крыса

DOI: 10.31857/S0869813922120068

К числу областей коры больших полушарий, участвующих в контроле автономных функций, относят поля префронтальной коры (prefrontal cortex, PFC), расположенные на медиальной, латеральной и, вероятно, орбитофронтальной поверхностях больших полушарий [1, 2]. Предполагается, что эти области коры реализуют свои автономные функции, взаимодействуя с так называемой центральной автономной сетью (central autonomic network, CAN), в которую также входит ряд структур, расположенных на разных уровнях нервной оси, вплоть до продолговатого и спинного мозга [3, 4]. Автономные функции медиальной и латеральной PFC изучены довольно подробно. Установлено, в частности, что медиальная префронтальная, в том числе инфраламбическая кора (infralimbic cortex, IL), участвует в контроле функций кровообращения [5, 6] и дыхания [7, 8]; она нередко рассматривается в качестве эффекторной или висцеромоторной автономной коры. Еще одна область представительства висцеральных систем идентифицирована в пределах латеральной префронтальной или островковой коры (insular cortex, IC) [9]. Что же касается коры орбитофронтальной поверхности (orbitofrontal cortex, OFC), то, в отличие от IL и IC эта область исследуется главным образом в контексте ее участия в реализации когнитивных и эмоциональных процессов [10, 11]. Однако имеются основания к тому, чтобы предполагать наличие в составе OFC одной или нескольких зон, которые способны взаимодействовать с CAN и участвовать в контроле активности автономных систем, в том числе систем дыхания и кровообращения [2]. Это предположение основано, главным образом, на результатах морфологических исследований, которые показали, в частности, что латеральная орбитальная кора (lateral orbital, LO) имеет связи не только с IL и IC [12], но и с другими структурами, входящими в CAN [13]. Еще одним важным критерием, которому должна соответствовать область коры, участвующая в контроле автономных функций, является изменение активности висцеральных систем при электрическом или химическом раздражении этой области коры [2, 14]. В некоторых старых работах содержатся экспериментальные данные о респираторных и циркуляторных эффектах электрической стимуляции больших областей OFC [15, 16], однако эти данные достаточно фрагментарны, и автономные эффекты стимуляции OFC по-прежнему требуют систематического экспериментального исследования. Ранее нами было установлено, что микроэлектростимуляция двух областей OFC вызывает изменения артериального давления анестезированной крысы [17]. Целью настоящего исследования стала дальнейшая экспериментальная проверка гипотезы о возможном участии OFC в контроле функций дыхания и кровообращения. Для этого следовало получить новые данные о влиянии микроэлектростимуляции латеральной орбитальной коры (lateral orbital, LO), которая входит в состав OFC, на параметры внешнего дыхания. Предполагалось сравнить в одних и тех же экспериментах респираторные и циркуляторные эффекты стимуляции LO с эффектами стимуляции IL, участие которой в контроле автономных функций установлено предшествующими исследованиями. Проявление специфических эффектов микроэлектростимуляции LO следовало бы рассматривать как подтверждение указанной гипотезы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были проведены на самцах крыс линии Wistar ($n = 6$) массой тела 250–300 г из ЦКП “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Условия содержания животных, а также процедуры, которым их подвергали при подготовке и проведении экспериментов соответствовали Приказу Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и были апробированы Комиссией по контролю за содержанием и использованием

лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (заключение Комиссии № 09/14 от 14 сентября 2022 г.).

Крыс вводили в состояние общей анестезии внутрибрюшинной инъекцией раствора уретана (1600 мг/кг); глубину анестезии контролировали, ориентируясь по реакции на неповреждающий болевой стимул (ущемление хвоста) и по выраженности роговичного рефлекса. Температуру тела измеряли и поддерживали на уровне 36.5–37.5°C при помощи термоконтроллера (ML295/R, ADInstruments, Новая Зеландия). Производили трахеостомию, в трахею вводили трахеостомическую трубку; в правой бедренной артерии устанавливали катетер, заполненный гепаринизированным (50 Ед/мл) физиологическим раствором. Животное переводили в прональную позицию, голову закрепляли в стереотаксическом аппарате (SR-6R-HT, Narishige, Япония) и производили локальную краниотомию над областями введения раздражающих электродов.

К трахеостомической трубке присоединяли пневмометрический датчик (MLT10L), подключенный ко входу пневмотахометра (FE141); артериальный катетер соединяли с датчиком давления (MLT1199), сигнал с которого поступал на вход мостового усилителя (FE224). Сигналы пневмотахограммы (pneumotachogram, PTG) и артериального давления (arterial pressure, AP) поступали на вход устройства сбора данных (PL35/8), регистрировались и обрабатывались в режимах on- и off-line при помощи специализированного пакета программ (LabChart 7). Помимо регистрации PTG и AP производили расчет объемно-временных параметров дыхания, которые позволяют объективно характеризовать паттерн дыхания, в том числе дыхательный объем (tidal volume, V_t), общую длительность дыхательного цикла (total respiratory cycle time, T_{tot}), максимальный воздушный поток на вдохе (maximum inspiratory flow, $V_{i_{max}}$) и максимальный воздушный поток на выдохе (maximum expiratory flow, $V_{e_{max}}$). Кроме того, в режиме on-line рассчитывали среднее артериальное давление (mean AP, MAP) и частоту сердечных сокращений (heart rate, HR).

Для стимуляции коры использовали монополярные вольфрамовые электроды с диаметром кончика 2–3 мкм, сопротивлением 0.1 МОм; индифферентный электрод погружали в мышцы шеи. Серии прямоугольных импульсов тока отрицательной полярности силой 150–200 мкА, длительностью 1 мс, частотой 50 имп/с подавали на электроды, используя изолированный стимулятор (модель 4100, A-M Systems, США). Продолжительность серий составляла 10 с. Характеристики раздражающих электродов и параметры электрических стимулов, использованных в наших экспериментах, обеспечивали условия для микроэлектростимуляции, то есть стимуляции ограниченного объема нервной ткани. Этот объем был локализован в пределах исследуемых областей коры, поскольку при смещении концов электродов за пределы IL и LO характерные ответы на их раздражение ослабевали и исчезали. Микроэлектростимуляции подвергались точки с координатами: 4.0–4.5 мм глубина от поверхности мозга, +2.5 мм относительно уровня bregma, 0.5 мм латеральнее сагиттальной плоскости (IL); 4.2 мм глубина от поверхности мозга, +3.2 мм относительно bregma; 3.2 мм латеральнее сагиттальной плоскости (LO). Координаты определяли по стереотаксическому атласу мозга крысы.

Эксперимент продолжался 2 ч. Через 20 мин после начала регистрации производили первую стимуляцию IL, еще через 20 мин – первую стимуляцию LO. В дальнейшем эти экспериментальные воздействия чередовали с интервалом 20 мин и, таким образом, в каждом эксперименте по три раза стимулировалась каждая из исследуемых областей коры. В общей сложности в 6 экспериментах было зарегистрировано по 18 ответов на стимуляцию каждой из областей коры.

При обработке экспериментальных данных определяли средние значения абсолютных величин учитываемых параметров и стандартную ошибку среднего. Для количественного описания эффектов микроэлектростимуляции исследуемых об-

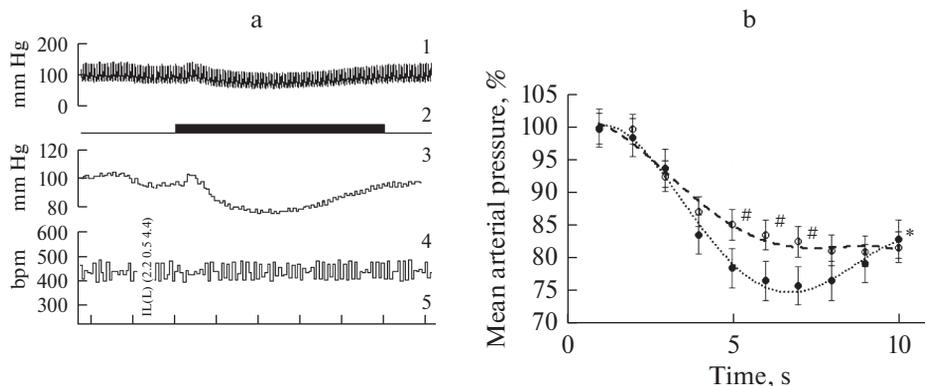


Рис. 1. Депрессорные эффекты микроэлектростимуляции IL и LO.

a – репрезентативный пример эффекта стимуляции IL. 1 – AP, 2 – отметка раздражения, 3 – MAP, 4 – HR, 5 – отметка времени, 2 с.

b – изменение MAP, развивающиеся в результате стимуляции LO (светлые маркеры) и IL (темные маркеры). Величина MAP выражена в процентах к величине этого показателя непосредственно перед нанесением стимула. На графиках представлены средние значения величин ($n = 18$) и стандартные ошибки. Пунктирами обозначены линии трендов, полученные в результате полиномиальной аппроксимации стандартными средствами Excel.

– различия между LO и IL достоверны (при $p < 0.05$); * – величина MAP на 10-й с стимуляции IL достоверно (при $p < 0.05$) больше его величины на 7-й с. Достоверность различий оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа.

ластей коры средствами пакета программ LabChart 7.0 производили посекундное измерение регистрируемых и рассчитываемых параметров до и во время стимуляции. Значения, полученные во всех экспериментах для каждой области коры ($n = 18$), заносили в таблицы MS Excel и подвергали дальнейшей обработке, выражая величину параметров после начала микроэлектростимуляции коры в процентах к их значениям до начала раздражения. Для каждой секунды рассчитывали среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего; эти величины использовали при построении графиков, отражающих изменения учитываемых параметров под влиянием микроэлектростимуляции коры. Достоверность различий между величинами определяли, используя метод однофакторного дисперсионного анализа и U-критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке нулевой гипотезы принимался равным 0.05. По завершении эксперимента животное усыпляли передозировкой анестетика и мозг извлекали для последующего гистологического контроля. Точки стимуляции верифицировали по трекам, оставшимся после извлечения электродов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Величина MAP в начале эксперимента, на 5-й минуте регистрации, составляла в среднем 98 ± 3 мм рт. ст., а HR равнялась 438 ± 4 уд./мин. В дальнейшем фоновые значения обоих показателей не претерпевали достоверных изменений, оставаясь стабильными до конца эксперимента. Непосредственно перед началом стимуляции IL величина MAP составляла в среднем 102 ± 3 мм рт. ст., а перед началом стимуляции LO 96 ± 4 мм рт. ст. Стимуляция каждой из этих областей вызывала снижение MAP, которое не сопровождалось заметными изменениями HR (рис. 1a).

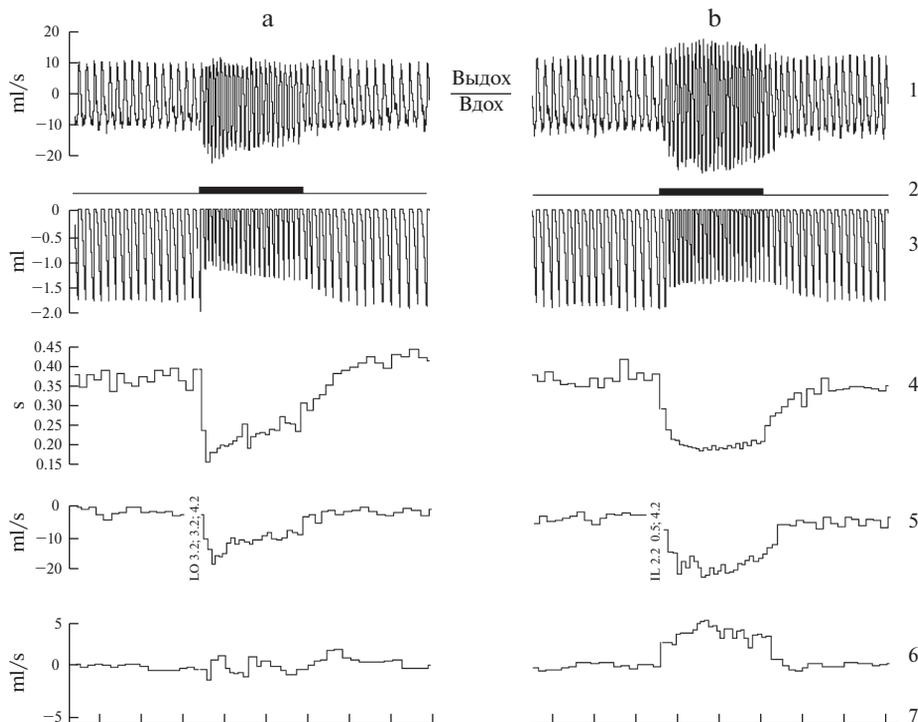


Рис. 2. Реакции системы внешнего дыхания анестезированной крысы на микроэлектростимуляцию ЛО (а) и ИЛ (б). 1 – РТГ; 2 – отметка раздражения; 3, 4, 5, 6 – соответственно V_t , T_{tot} , $V_{i_{max}}$, $V_{e_{max}}$; 7 – отметка времени, 2 с.

Абсолютная величина амплитуды депрессорных ответов, измеренных на 7-й с стимуляции для ЛО, составляла 18 ± 2 мм рт. ст. а для ИЛ эта величина равнялась 28 ± 1 мм рт. ст.; различия были достоверны при $p < 0.01$. Были обнаружены определенные отличия в динамике развития депрессорных ответов (рис. 1б). Они заключались в том, что на фоне стимуляции ЛО происходило постепенное снижение МАР до минимальных значений, которые сохранялись до окончания действия стимула. Напротив, депрессорный эффект стимуляции ИЛ постепенно ослабевал на фоне действующего стимула

Специфические перестройки паттерна дыхания наблюдались в ответ на стимуляцию как ЛО (рис. 2а, 1), так и ИЛ (рис. 2б, 1). Раздражение ЛО приводило к уменьшению V_t (рис. 2а, 3) и T_{tot} (рис. 2а, 4), а также увеличению $V_{i_{max}}$ (рис. 2а, 5), при том, что каких-либо определенных изменений $V_{e_{max}}$ наблюдать не удалось (рис. 2а, 6). Стимуляция ИЛ также уменьшала V_t (рис. 2б, 3) и T_{tot} (рис. 2б, 4), увеличивала $V_{i_{max}}$ (рис. 2а, 5), но, в отличие от ЛО, увеличивала также и $V_{e_{max}}$ (рис. 2б, 6).

Количественный анализ объемно-временных параметров дыхания подтвердил эти наблюдения и позволил обнаружить некоторые характерные особенности в динамике этих параметров на фоне стимуляции каждой из исследованных областей (рис. 3). Под влиянием стимуляции ЛО величина V_t снижалась до минимальных значений, которые составляли $80 \pm 5\%$ от исходной величины уже на 3-й с раздра-

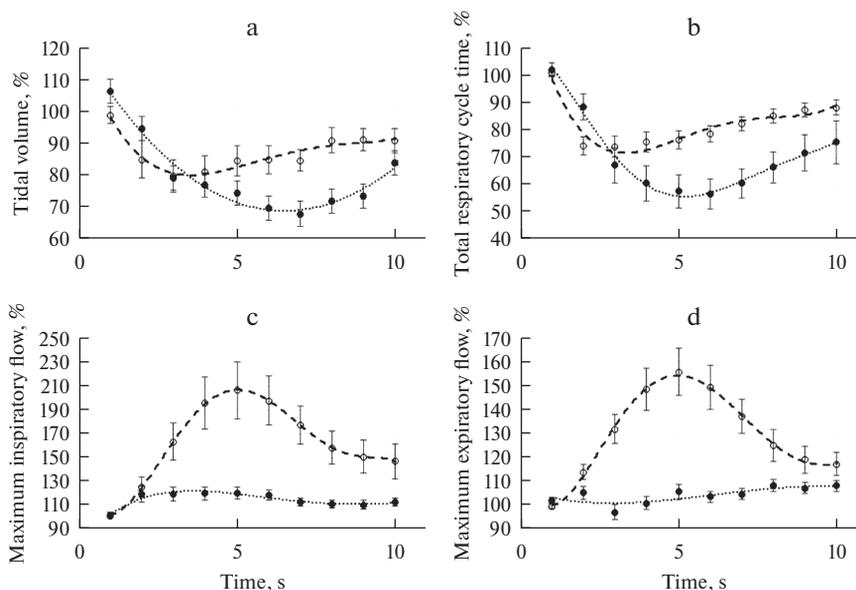


Рис. 3. Изменение объемно-временных параметров дыхания под влиянием стимуляции LO (темные кружки) и IL (светлые кружки).

a, b, c и d – соответственно V_t , T_{tot} , $V_{i_{max}}$ и $V_{e_{max}}$. Все величины выражены в процентах к их значениям непосредственно перед нанесением стимула.

На графиках представлены средние значения величин ($n = 18$) и стандартные ошибки. Пунктирами обозначены линии трендов, полученные в результате полиномиальной аппроксимации стандартными средствами Excel.

жения (рис. 3а). В дальнейшем V_t увеличивался, “ускользая” из-под действия стимула и, начиная с 7-й с, стабилизировался на уровне 90% от исходного. На фоне стимуляции IL снижение V_t происходило значительно дольше; этот показатель достигал минимальной величины, которая составляла около $70 \pm 4\%$ от исходных значений, на 6-й с. После достижения минимума этот показатель начинал постепенно расти, достигая $84 \pm 7\%$ от исходной величины на последней секунде стимуляции. Сходным образом изменялась длительность дыхательного цикла (рис. 3б). В течение первых 2-х с стимуляции LO этот параметр уменьшался до $74 \pm 3\%$, затем T_{tot} постепенно увеличивалась, достигая 90% от исходной величины к концу стимуляции. На фоне стимуляции IL длительность дыхательного цикла снижалась в течение 5 с до $57 \pm 5\%$ от исходной величины. Электростимуляция LO приводила к быстрому росту максимальных потоков на вдохе, которые в течение первых двух секунд стимуляции увеличивались на $20 \pm 6\%$ от исходной величины, оставались на достигнутом уровне в течение 3-х последующих секунд, а затем постепенно снижались, не достигая исходной величины (рис. 3с). Изменения максимальных потоков на выдохе оказались статистически недостоверными (рис. 3д). В отличие от LO, стимуляция IL увеличивала максимальные потоки как на вдохе (рис. 3с), так и на выдохе (рис. 3д). Оба параметра росли в течение первых 5 с стимуляции, а затем также ускользали из-под действия раздражителя (рис. 3с, d). Таким образом, эксперименты показали, что микроэлектростимуляция LO анестезированной крысы приводит к кратковременному падению MAP, такой же эффект вызывала стимуляция IL. Стимуляция LO вызывала стабильно воспроизводимую перестройку пат-

терна дыхания, которая имела характерные отличия от изменений, вызванных раздражением IL.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Депрессорный эффект стимуляции IL, который воспроизводился в наших экспериментах, наблюдался ранее и другими авторами. Так, в экспериментах на лабораторных крысах, анестезированных галотаном, монополярное раздражение медиальной префронтальной коры отрицательными импульсами тока приводило к падению MAP в среднем на 15 ± 5 мм рт. ст. [19], что весьма близко к величине ответов, зарегистрированных в настоящей работе. Сходные результаты были получены и в более поздних исследованиях [20, 21]. В некоторых экспериментах депрессорные ответы сопровождались небольшим снижением HR [22], однако мы подобного эффекта не наблюдали. В целом реакция системы кровообращения на стимуляцию IL, которая воспроизводилась в наших экспериментах, напоминала ту, которая наблюдалась другими авторами, что свидетельствует, в том числе, и об адекватности условий наших экспериментов. Механизмы, реализующие депрессорный эффект стимуляции IL достаточно хорошо изучены. Известно, в частности, что стимуляция приводит к торможению симпатовозбуждающих нейронов, расположенных в пределах ростральной части вентролатеральной области продолговатого мозга и ослаблению симпатического драйва [19, 21]. Установлено, что влияние медиальной префронтальной коры на пресимпатические нейроны продолговатого мозга опосредуется нейронами латерального гипоталамуса (lateral hypothalamus, LH) и, возможно, центрального серого вещества (periaqueductal gray, PAG) [23]. Кроме того, есть данные о том, что в этот процесс вовлечены нейроны ядра одиночного тракта, принимающего афферентные потоки от барорецепторов, инициирующих барорефлекс [24]. Возможно, что отсутствие изменений IL, связанных с депрессорными ответами на стимуляцию IL, можно объяснить снижением барорефлекторной чувствительности, поскольку известно, что медиальная префронтальная кора способна модулировать активность парасимпатического плеча барорефлекса [25].

Депрессорные ответы на стимуляцию OFC были впервые описаны нами в предшествующей работе [17]. Было установлено, в частности, что преобладающей реакцией на микроэлектростимуляцию передних отделов LO (на уровне +2.5 мм относительно уровня bregma) были также депрессорные ответы, но несколько меньшей амплитуды, чем те, которые описаны в настоящем исследовании. Этот результат может быть связан с тем обстоятельством, что задние отделы LO, которые подвергались стимуляции в настоящей работе, образуют более плотные связи со стволовыми автономными центрами [13]. Поскольку нисходящие проекции из OFC и, в частности, из LO, достигают уровня LH и PAG, можно предположить, что механизмы реализации депрессорных эффектов стимуляции LO близки к тем, которые установлены для IL. Вместе с тем следует учитывать, что LO не образует прямых проекций к структурам продолговатого мозга и, следовательно, в отличие от IL не может оказывать прямого воздействия на рефлекторные механизмы кардиореспираторного контроля. Кроме того, в настоящей работе впервые описана динамика АД анестезированной крысы на фоне продолжающейся стимуляции OFC и было установлено, что депрессорные ответы на стимуляцию LO и IL отличаются не только по амплитуде (ответы на стимуляцию IL достоверно больше), но и по временному течению. Поэтому пути реализации депрессорного эффекта стимуляции LO, по-видимому, имеют определенные особенности по сравнению с IL и требуют дополнительного экспериментального исследования. Учитывая наличие прямых связей между LO и IL, а также общеизвестную висцеромоторную функцию IL,

можно предположить, что IL принимает участие в реализации депрессорных ответов на стимуляцию LO.

Система внешнего дыхания анестезированной крысы реагировала на микроэлектростимуляцию каждой из исследованных областей коры специфическими изменениями паттерна дыхания. Стимуляция IL приводила к увеличению $V_{i_{max}}$, $V_{e_{max}}$, а также к уменьшению V_t и T_{tot} , причем наблюдалось постепенное “ускользание” системы дыхания из-под действия раздражителя. Подобная реакция на раздражение IL уже была описана нами в одной из предшествующих работ [7]. Реакция респираторной системы анестезированной крысы на стимуляцию LO впервые описана в настоящей работе, и она имеет вполне определенные черты как сходства, так и отличия по сравнению с реакцией на стимуляцию IL. Прежде всего, на фоне стимуляции LO не меняется $V_{e_{max}}$, а изменения остальных параметров в процентном отношении менее значительны. Кроме того, динамика изменений учитываемых параметров при раздражении IL и LO различна, поскольку V_t и T_{tot} снижаются до минимальных значений, а $V_{e_{max}}$ достигает максимальных величин быстрее на фоне стимуляции LO, чем на фоне стимуляции IL.

Как известно, объемно-временные параметры дыхания определяются сложной сетью респираторных нейронов, расположенных на уровне продолговатого мозга и моста [26]. Однако паттерн дыхания может модулироваться структурами, расположенными на более высоких уровнях CAN, в том числе структурами переднего мозга и различными областями коры [27]. Специальные эксперименты с введением ретроградного маркера в PAG, а также в ядра, образующие бульбо-понтинный генератор паттерна дыхания, в том числе в мостовое субпарабрахиальное ядро Келликера–Фузе (KF_n), в комплексы пре-Бетцингера и Бетцингера образующие вентральную респираторную группу, показали, что IL образует связи с большинством из перечисленных структур, причем наибольшей плотностью обладают связи с PAG и KF_n [27]. Подобные связи образовывали и многие другие области коры, в том числе IC, моторная и соматосенсорная кора. Однако в OFC, в том числе в LO, меченые нейроны отсутствовали и, следовательно, LO не образует прямых связей с бульбопонтинным генератором паттерна дыхания. Вместе с тем, по другим данным, LO образует выраженные проекции к PAG [13, 28], которое принимает участие в модуляции дыхания при вокализации и оборонительном поведении [29, 30].

Таким образом, полученные результаты показали, что микроэлектростимуляция LO вызывает специфические кардиореспираторные реакции и подтвердили предположение о возможном участии этой области OFC в контроле функций дыхания и кровообращения. Можно полагать, что LO реализует свое влияние на эти функции, взаимодействуя со структурами CAN на кортикальном и стволовом уровне. Один из наиболее вероятных вариантов такого взаимодействия может обеспечиваться известными прямыми связями между LO и висцеромоторной IL, однако это предположение требует прямой экспериментальной проверки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Т.Н.К. – планирование и проведение экспериментов, обработка результатов, подготовка рукописи. Е.А.Г. – идея работы, проведение экспериментов, обработка результатов, подготовка рукописи. Т.С.Т. – проведение экспериментов, обработка результатов. Г.И.Р. – проведение экспериментов, обработка результатов. В.Г.А. – идея работы, планирование экспериментов, редактирование рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы по Программе “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения кон-

курентоспособности общества и государства” Тема 64.1 (0134-2019-0001) “Раскрытие механизмов взаимодействия молекулярно-клеточных и системных регуляций внутренних органов”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Smith R, Thayer JF, Khalsa SS, Lane RD* (2017) The hierarchical basis of neurovisceral integration. *Neurosci Biobehav Rev* 75: 274–296.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.02.003>
2. *Aleksandrov VG, Kokurina TN, Rybakova GI, Tumanova TS* (2021) Autonomic functions of the prefrontal cortex. *Human Physiol* 47(5): 571–578.
<https://doi.org/10.1134/S0362119721050029>
3. *Benarroch EE* (1993) The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective. *Mayo Clinic Proc* 68(10): 988–1001.
[https://doi.org/10.1016/s0025-6196\(12\)62272-1](https://doi.org/10.1016/s0025-6196(12)62272-1)
4. *Lamotte G, Shouma K, Benarroch EE* (2021) Stress and central autonomic network. *Auton Neurosci* 235: 102870.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102870>
5. *Sévoz-Couche C, Comet MA, Bernard JF, Hamon M, Laguzzi R* (2006) Cardiac baroreflex facilitation evoked by hypothalamus and prefrontal cortex stimulation: role of the nucleus tractus solitarius 5-HT_{2A} receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(4): R1007–R1015.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00052.2006>
6. *Hassan SF, Cornish JL, Goodchild AK* (2013) Respiratory, metabolic and cardiac functions are altered by disinhibition of subregions of the medial prefrontal cortex. *J Physiol* 591(23): 6069–6088.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.262071>
7. *Alexandrov VG, Ivanova TG, Alexandrova NP* (2007) Prefrontal control of respiration. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 5(Pt 1): 17–23.
8. *Aleksandrov VG, Mercuriev VA, Ivanova TG, Tarasievich AA, Aleksandrova NP* (2009) Cortical control of Hering-Breuer reflexes in anesthetized rats. *Eur J Med Res (Suppl 4)*: 1–5.
<https://doi.org/10.1186/2047-783x-14-s4-1>
9. *Aleksandrov VG, Aleksandrova NP* (2015) The role of the insular cortex in the control of visceral functions. *Human Physiol* 41(5): 553–561.
<https://doi.org/10.1134/S0362119715050023>
10. *Rempel-Clower NL* (2007) Role of orbitofrontal cortex connections in emotion. *Ann N Y Acad Sci* 1121: 72–86.
<https://doi.org/10.1196/annals.1401.026>
11. *Izquierdo A* (2017) Functional heterogeneity within rat orbitofrontal cortex in reward learning and decision making. *J Neurosci* 37(44): 10529–10540.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1678-17.2017>
12. *Barreiros IV, Ishii H, Walton ME, Panayi MC* (2021) Defining an orbitofrontal compass: Functional and anatomical heterogeneity across anterior-posterior and medial-lateral axes. *Behav Neurosci* 135(2): 165–173.
<https://doi.org/10.1037/bne0000442>
13. *Babalian A, Eichenberger S, Bilella A, Girard F, Szabolcsi V, Roccaro D, Alvarez-Bolado G, Xu C, Celio MR* (2019) The orbitofrontal cortex projects to the paravox nucleus of the ventrolateral hypothalamus and to its targets in the ventromedial periaqueductal grey matter. *Brain Struct Funct* 224(1): 293–314.
<https://doi.org/10.1007/s00429-018-1771-5>
14. *Cechetti DF, Saper CB* (1990) Role of the cerebral cortex in autonomic function. *Central Regulation of Autonomic Functions*. New York: Oxford Univer Press.
15. *Kaada BR* (1951) Somato-motor, autonomic and electrocorticographic responses to electrical stimulation of rhinencephalic and other structures in primates, cat, and dog; a study of responses from the limbic, subcallosal, orbito-insular, piriform and temporal cortex, hippocampus-forebrain and amygdala. *Acta Physiol Scand Suppl* 24(83): 1–262.
16. *Neafsey EJ* (1990) Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations. *Prog Brain Res* 85: 147–165.
[https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62679-5](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62679-5)
17. *Александров ВГ, Губаревич ЕА, Туманова ТС, Кокурина ТН, Маркова АЮ, Рыбакова ГИ* (2021) Влияние электростимуляции орбитофронтальной коры на систему кровообращения анестезированной крысы. *Интеграция физиол* 2(3): 297–306. [Aleksandrov VG, Gu-

- barevich EA, Tumanova TS, Kokurina TN, Markova AYu, Rybakova GI* (2021) The effect of electrical stimulation of the orbitofrontal cortex on the circulatory system of an anesthetized rat. *Integrat Physiol* 2(3): 297–306. (In Russ)].
[https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62679-5](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62679-5).
18. *Paxinos G, Watson C* (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth edition. G Paxinos, C Watson (eds) Acad Press.
 19. *Verberne AJ* (1996) Medullary sympathoexcitatory neurons are inhibited by activation of the medial prefrontal cortex in the rat. *Am J Physiol* 270(4 Pt 2): R71371–71379.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.270.4.R713>
 20. *Owens NC, Verberne AJ* (2000) Medial prefrontal depressor response: involvement of the rostral and caudal ventrolateral medulla in the rat. *J Auton Nerv Syst* 78(2–3): 86–93.
[https://doi.org/10.1016/s0165-1838\(99\)00062-4](https://doi.org/10.1016/s0165-1838(99)00062-4)
 21. *Resstel LB, Corrêa FM* (2006) Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. *Auton Neurosci* (126–127): 130–138.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.20.06.02.022>
 22. *Sévoz-Couche C, Comet MA, Bernard JF, Hamon M, Laguzzi R* (2006) Cardiac baroreflex facilitation evoked by hypothalamus and prefrontal cortex stimulation: role of the nucleus tractus solitarius 5-HT_{2A} receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(4): R1007–R1015.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00052.2006>
 23. *Fisk GD, Wyss JM* (1997) Pressor and depressor sites are intermingled in the cingulate cortex of the rat. *Brain Res* 754(1–2): 204–212.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00076-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00076-0)
 24. *Owens NC, Sartor DM, Verberne A.* (1999) Medial prefrontal cortex depressor response: role of the solitary tract nucleus in the rat. *Neuroscience* 89(4): 1331–1346.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00389-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00389-3)
 25. *Resstel LB, Fernandes KB, Corrêa FM* (2004) Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. *Brain Res* 1015(1–2): 13–144.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.04.065>
 26. *Rybak IA, Shevtsova NA, Paton JF, Dick TE, St-John WM, Mörschel M, Dutschmann M* (2004) Modeling the ponto-medullary respiratory network. *Respir Physiol Neurobiol* 143(2–3): 307–319.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.03.020>
 27. *Trevizan-Bau P, Dhingra RR, Furuya WI, Stanić D, Mazzone SB, Dutschmann M* (2021) Forebrain projection neurons target functionally diverse respiratory control areas in the midbrain, pons, and medulla oblongata. *J Comp Neurol* 529(9): 2243–2264.
<https://doi.org/10.1002/cne.25091>
 28. *Bilella A, Alvarez-Bolado G, Celio MR* (2016) The Foxb1-expressing neurons of the ventrolateral hypothalamic paraventricular nucleus project to defensive circuits. *J Comp Neurol* 524(15): 2955–2981.
<https://doi.org/10.1002/cne.24057>
 29. *Subramanian HH, Balnave RJ, Holstege G* (2008) The midbrain periaqueductal gray control of respiration. *J Neurosci* 28(47): 12274–12283.
<https://doi.org/10.1002/cne.24057>
 30. *Faull OK, Subramanian HH, Ezra M, Pattinson KT* (2019) The midbrain periaqueductal gray as an integrative and interoceptive neural structure for breathing. *Neurosci Biobehav Rev* 98: 135–144.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.020>

Microelectrostimulation of the Rat Lateral Orbital Cortex Causes Specific Reactions of the Circulation and Respiration

T. H. Kokurina^a, E. A. Gubarevich^a, G. I. Rybakova^a,
 T. S. Tumanova^{a, b}, and V. G. Aleksandrov^{a, *}

^a*Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia*

^b*The Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: aleksandrovv@infran.ru

It has been established that the areas of the autonomic prefrontal cortex, located on the medial and lateral surfaces of the cerebral hemispheres, are elements of the central autonomic network and take part in the control of respiratory and circulatory functions. The results of morphological studies indicate that the cortical area on the orbital and frontal surfaces of the hemisphere forms direct connections with the autonomic cortex and other structures of the central autonomic network. These data suggest the involvement of

the orbitofrontal cortex in the control of autonomic functions. The purpose of this study was a direct experimental verification of the hypothesis about the possible involvement of the lateral orbital cortex in the control of respiratory and circulatory functions. For this purpose, in acute experiments on laboratory rats anesthetized with urethane, the reactions of the circulatory and respiratory systems to local microelectrostimulation of the lateral orbital and medial prefrontal (infralimbic) cortex by series of rectangular current pulses were recorded. The experiments showed that stimulation of each of the indicated cortical areas of the same experimental animal caused specific reactions of the respiratory system, which manifested themselves in characteristic changes in the volume-time parameters of external respiration. The circulatory system responded to stimulation of the studied areas of the cortex by a gradual decrease in blood pressure against the background of continued stimulation, and depressor responses to stimulation of the infralimbic and lateral orbital cortex differed in amplitude and temporal course. The results obtained confirmed the hypothesis of the possible involvement of the lateral orbital cortex in the control of respiratory and circulatory functions. It is possible that the lateral orbital cortex realizes its influence on the functions of respiration and circulation by interacting with the visceromotor infralimbic cortex; this assumption requires experimental verification.

Keywords: orbitofrontal cortex, infralimbic cortex, central autonomic network, respiration, circulation, rat

СОКРАТИТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ КАПСУЛЫ БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ БЫКА НА РАННЕЙ СТАДИИ ВОСПАЛЕНИЯ

© 2022 г. Г. И. Лобов*

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

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

Поступила в редакцию 27.09.2022 г.

После доработки 27.10.2022 г.

Принята к публикации 01.11.2022 г.

Воспаление выявляется не только при инфекциях или травмах, но и при многих других патологических процессах, связанных с нарушением функции тканей, таких, как сахарный диабет 2-го типа, атеросклероз, инфаркт миокарда и др. В процессе развития и разрешения воспаления во всех случаях вовлекается лимфатическая система, и в частности лимфатические узлы (ЛУ), в которые поступают продукты деградации тканей, фрагменты бактерий, антигенпрезентирующие клетки и различные цитокины из очага воспаления. Целью работы было исследование механизмов ингибирования сократительной функции капсулы брыжеечных ЛУ быка, способствующих ремоделированию ЛУ на ранней стадии воспаления. Изолированные полоски капсулы ЛУ, обработанные липополисахаридом (LPS), исследовали в миографе. Полученные данные показывают, что при воздействии LPS растяжимость капсулы ЛУ возрастает вследствие ингибирования сократительной функции гладкомышечных клеток, входящих в состав капсулы. Установлено, что действие LPS приводит к экспрессии в клетках капсулы ЛУ индуцибельной NO-синтазы, циклооксигеназы 2 и цистатионин- γ -лиазы. Продуцируемые этими ферментами NO, простагландины и H₂S не только угнетают фазную сократительную функцию гладкомышечных клеток капсулы, но и приводят к существенному снижению тонуса. Продуцируемый в значительном количестве NO активирует сигнальный путь NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG \rightarrow K_{ATP} – каналы гладкомышечных клеток, кроме этого он оказывает непосредственное влияние и на другие регуляторные механизмы. Впервые показано, что H₂S, синтезированный цистатионин- γ -лиазой в капсуле ЛУ, обработанной LPS, не только оказывает непосредственный релаксирующий эффект, но и усиливает NO-опосредованную релаксацию гладкомышечных клеток капсулы. Таким образом, результаты данного исследования предоставляют доказательства, что уже на ранней стадии LPS-индуцируемого воспаления в капсуле брыжеечных ЛУ быка происходят изменения, направленные на создание условий для увеличения размеров ЛУ и накопления иммунных клеток.

Ключевые слова: лимфатический узел, капсула, гладкомышечные клетки, липополисахарид, воспаление

DOI: 10.31857/S0869813922120093

У млекопитающих наряду с кровеносной системой, доставляющей в ткани кислород и питательные вещества, а также обеспечивающей быстрое удаление из тканей метаболитов, имеется и вторая транспортная система – лимфатическая, представленная лимфатическими сосудами и лимфатическими узлами (ЛУ), встроен-

ными в сеть лимфатических сосудов [1, 2]. Лимфатическая сосудистая сеть представляет собой открытую систему однонаправленного транспорта жидкости (из тканей в кровь), функционирующую под низким переменным давлением. В лимфатической системе нет централизованного насоса, транспорт лимфы осуществляется лимфатическими сосудами, имеющими в составе стенки гладкомышечные клетки и клапаны, разделяющие лимфатические сосуды на отдельные лимфангионы [3, 4]. Лимфатические сосуды транспортируют лимфу и таким образом выполняют несколько важных функций: (1) поддерживают гомеостаз интерстициальной жидкости, (2) обеспечивают транспорт хиломикронов, образующихся в процессе абсорбции пищевых жиров, (3) переносят крупномолекулярные гормоны, продуцируемые нейроэндокринными клетками и (4) доставляют иммунные клетки и антигены из периферических тканей в лимфатические узлы (ЛУ) и [1, 2]. Лимфа содержит множество антигенов, при этом максимальная концентрация антигенов выявляется в кишечной лимфе (антигены из состава пищи, антигены комменсальной флоры и аутоантигены) [5]. Хотя лимфатические сосуды не относятся к иммунной системе, они являются важнейшими участниками иммунного процесса [6]. Лимфатические сосуды модулируют иммунные реакции, транспортируя бактерии, чужеродные антигены, твердые частицы, экзосомы и иммунные клетки в регионарные ЛУ [7].

ЛУ являются обязательными элементами лимфатической системы млекопитающих, у человека их число варьирует от 500 до 800. ЛУ расположены в лимфатической сосудистой сети в стратегически важных участках, и весь объем образующейся в организме лимфы проходит через один, а чаще – через несколько ЛУ [8]. В ЛУ, выполняющих функции биологических фильтров, происходит встреча антиген-презентирующих клеток и лимфоцитов, в их фолликулах осуществляется клональная экспансия антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов [9]. Основными резидентными клетками ЛУ являются стромальные (фибробластные ретикулярные клетки, FRC) и лимфатические эндотелиальные клетки (LEC). В ЛУ человека идентифицировано шесть типов FRC, они формируют кондуитную систему ЛУ и продуцируют различные хемокины, градиенты которых обеспечивают передвижение иммунных клеток и их упорядоченное расположение в ЛУ. В ЛУ также идентифицировано до шести типов LEC, выполняющих различные функции. Основная функция LEC, расположенных на полу и потолке субкапсулярного синуса – регуляция проникновения дендритных клеток и антигенов в кору ЛУ. LEC паракортикального синуса создают градиент сфингозин-1-фосфата (S1P) и таким образом регулируют выход Т-лимфоцитов из ЛУ [10]. Лимфоциты являются транзитными клетками в ЛУ, они поступают в ЛУ двумя путями: 1) из крови через стенку венул с высоким эндотелием (HEV), 2) с афферентной лимфой из дренируемого органа и выходят из ЛУ по эфферентным лимфатическим сосудам.

Установлено, что приток в ЛУ чужеродных антигенов (растворимых или поглощенных дендритными клетками) вызывает быстрое увеличение проникновения в ЛУ лимфоцитов, активации и пролиферации FRC и LEC, что приводит к ремоделированию ЛУ и увеличению его размеров [11]. ЛУ обладают уникальной особенностью значительно изменять размеры при воспалении. Их объем может увеличиваться за несколько дней в 10–20 раз по сравнению с размером в физиологическом состоянии, при этом увеличение размеров сопровождается пролиферативным расширением и ремоделированием сосудисто-стромального компартмента ЛУ с сохранением его основополагающей структуры [12].

С внешней стороны ЛУ покрыты капсулой. Основой капсулы и отходящих от нее трабекул являются соединительнотканнные элементы – коллаген и эластин [13]. Капсула и трабекулы выполняют в ЛУ функцию соединительнотканнного каркаса, поддерживающего форму и размеры ЛУ, и являются наиболее жесткими элемента-

ми ЛУ [14, 15]. В капсуле ЛУ различных видов животных и человека помимо коллагена и эластина представлены также и активные элементы — гладкомышечные клетки, расположенные пучками, ориентированными в разных направлениях [16]. Показано, что максимальное количество гладкомышечных клеток находится на выпуклой стороне ЛУ, противоположной по отношению к воротам, а в области ворот плотность миоцитов минимальна [17]. Установлено, что гладкомышечные клетки капсулы ЛУ синхронно сокращаются и развивают значительную силу, достаточную для повышения давления в ЛУ и продвижения лимфы по синусам и кондуитам ЛУ [18, 19]. Таким образом, ЛУ, выполняя в организме сложные иммунные функции, вместе с тем наряду с лимфатическими сосудами, являются и активными насосами в лимфатической системе. “При сокращении мышечных элементов ЛУ лимфа выжимается из него, как из губки...” [20].

В последнее десятилетие функции различных клеток ЛУ интенсивно изучались как *in vivo* и *in vitro*, так и посредством моделирования [5, 21]. Ежегодно в Pubmed индексируются от 1000 до 1500 работ с описанием иммунных реакций в ЛУ. При этом на фоне значительного объема информации о роли FRC и LEC в процессе воспалительного увеличения размеров ЛУ, практически нет данных об участии в процессе ремоделирования клеток капсулы ЛУ. С учетом важности процессов ремоделирования и гипертрофии ЛУ при воспалении целью данной работы было исследование механических свойств капсулы ЛУ и функционального состояния гладкомышечных клеток капсулы при моделировании воспаления *ex vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все процедуры, выполненные в данном исследовании, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Протокол № 17/6 от 11.04.2022 г.). Материал для исследования получали в цехе забоя животных племенного завода “Приневское”. Брыжеечные ЛУ второго порядка забирали у молодых быков (*Bos Taurus*, возраст — 18–20 мес., $n = 19$) через 10–12 мин после обескровливания животных и доставляли в лабораторию в охлажденном (2–4°C) физиологическом солевом растворе (PSS). Состав раствора: NaCl — 120.4; KCl — 5.9; CaCl₂ — 2.5; MgCl₂ — 1.2; NaH₂PO₄ — 1.2; NaHCO₃ — 15.5; глюкоза — 11.5 мМ (все вещества х. ч., производства Химпром, РФ) + 10 г/л бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich). В лаборатории из каждого ЛУ вырезали 2–3 полоски капсулы (рис. 1а). При определении локализации и направления полосок капсулы ЛУ мы исходили из литературных данных, свидетельствующих, что максимальное количество гладкомышечных клеток располагается в капсуле ЛУ на стороне, противоположной воротам [22]. Полоски капсулы шириной 2 мм тщательно очищали от прилегающей соединительной ткани и перикапсулярного жира. В состав полоски входила капсула, содержащая гладкомышечные клетки, фибробласты и некоторое количество макрофагов, и субкапсулярный синус, основную массу которого составляли эндотелиальные клетки ЛУ. Подготовленные полоски до исследования хранили в PSS в холодильнике на льду. Перед опытом полоски капсулы ЛУ в случайном порядке были разделены на две группы. Все полоски инкубировали (CO₂-инкубатор CO48300001, Eppendorf, Германия) на протяжении 6 ч в среде F-10 Ham (“ДИА-М”, Россия) с добавлением бензилпенициллина (100 ЕД/мл) и стрептомицина (10 мг/мл) при 38°C. Всего было изучено 52 полоски капсулы ЛУ: 22 из них инкубировали в среде F-10 Ham (контрольная группа) и 30 — в F-10 Ham + липополисахарид (LPS *Escherichia coli* 0111:B4) [23]. 7 полосок из второй группы инкубировали в среде с LPS + циклогексимид.

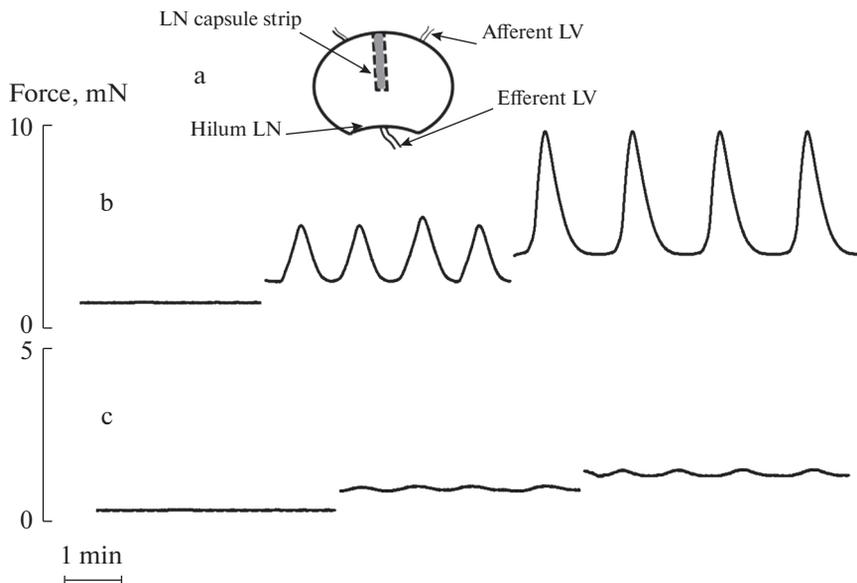


Рис. 1. Сократительная активность капсулы брыжеечных ЛУ быка, инкубированных в среде F-10 Ham и в среде F-10 Ham + LPS: (a) – схема ЛУ и расположение в ЛУ полоски капсулы, используемой в эксперименте, (b) – сила, развиваемая капсулой, инкубированной в среде F-10 Ham, (c) – сила, развиваемая капсулой, инкубированной в среде F-10 Ham + LPS. Кривые в левой части рисунка отражают сократительную функцию капсулы ЛУ при увеличении длины на 0.5 мм, в средней части – то же при увеличении длины на 1.0 мм, в правой части – то же при увеличении длины на 2.0 мм.

По завершении инкубации препараты дважды промывали PSS и к концам полосок прикрепляли шелковые лигатуры таким образом, чтобы расстояние между ними составляло 5 мм. Размеры полосок определяли под микроскопом МССО с измерительным окуляром (ЛОМО, РФ). Подготовленные полоски размещали в термостатируемой камере миографа, через которую непрерывно со скоростью 2 мл/мин протекал PSS, аэрированный газовой смесью, состоящей из 95% O₂ и 5% CO₂. Температуру раствора поддерживали на уровне $38 \pm 0.1^\circ\text{C}$, pH 7.40 ± 0.02 . Одну лигатуру прикрепляли к датчику силы FORT-10 (WPI, США), а вторую – к микроманипулятору с микрометром, позволяющему изменять и измерять длину полоски. Сигнал от датчика поступал на вход усилителя INA333 (Texas Instruments Incorporated), далее – в сигма-дельта АЦП, встроенный в микроконтроллер STM32F373 (STMicroelectronics). Затем поток данных с частотой 50 Гц поступал на USB-порт компьютера и обрабатывался программой регистрации, разработанной Институтом экспериментальной медицины и написанной на языке (C++), обеспечивавшей непрерывную запись информации с датчика на протяжении всего эксперимента.

В первой серии опытов исследовали механические свойства полосок капсулы ЛУ. После уравнивания полосок капсулы в ненагруженном состоянии на протяжении 40 мин их подвергали процедуре растяжения-активации. Длину полосок пошагово увеличивали (с шагом 500 мкм), по завершении релаксации и установления стабильного уровня силы полоски активировали посредством замены в камере миографа PSS на активирующий раствор (AS), в котором весь Na⁺ был заменен на K⁺ + 20 мкМ норадреналина. AS действовали до развития полосками максимальной силы. После этого из камеры миографа удаляли AS и заменяли его

на проточный PSS до установления постоянного натяжения полосок. Затем вновь увеличивали длину полоски капсулы. Поэтапное увеличение длины полосок капсулы осуществляли до развития ими максимальной активной силы и последующего ее снижения до ~60% от максимальной [19]. После каждого шага увеличения длины измеряли пассивную силу и рассчитывали пассивное натяжение посредством деления зарегистрированной силы (в Н) на длину полоски (в м), а после активации полоски – общую силу и рассчитывали общее натяжение (при тоническом сокращении). Активное натяжение определяли посредством вычитания из общего натяжения полоски величины ее пассивного натяжения. С целью сравнения натяжений среди полосок капсулы ЛУ разного диаметра, длину полосок (L) нормализовали к оптимальной длине (L₀), при которой полоски капсулы генерировали максимальное активное натяжение. Соответственно, длину полосок на графиках выражали как отношение реальной длины к L₀ (L/L₀).

Во второй серии опытов полоски подвергали исходному натяжению в 2.2 N/m. При таком исходном натяжении после 30-минутной стабилизации натяжение полосок капсулы ЛУ контрольной группы устанавливалось на уровне, соответствующем трансмуральному давлению в ЛУ около 4 см водн. ст. [19]. В опытах по исследованию механизмов ингибирующего действия LPS на сократительную функцию капсулы ЛУ полоски обрабатывали на протяжении 20 мин ингибиторами ферментов, продуцирующих NO, простагландины и H₂S с последующим измерением величины сокращений при действии AS. В настоящей работе использовали следующие реактивы (все приобретены в Sigma-Aldrich): циклогексимид (Cycloheximide), 10 мкМ; норадреналин (Norepinephrine bitartrate), 20 мкМ; папаверин (Papaverine hydrochloride), 10 мкМ; 1400W (N-([3-(Aminomethyl)phenyl] methyl)ethanimidamide dihydrochloride), 20 мкМ; DL-пропаргилглицин (DL-Propargylglycine, PPG), 10 мкМ; цецекоксиб (Celecoxib), 10 мкМ; 1H-[1, 2, 4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), 10 мкМ; Rp-8-bromo-cGMPS, 30 мкМ; глибенкламид (Glibenclamide), 10 мкМ; липополисахарид (LPS *Escherichia coli* O55:B5), 100 нг/мл. При инкубировании полосок капсулы ЛУ применяли антибиотики: бензилпенициллина натриевая соль производства “Красфарма”, Россия, 100 ЕД/мл и стрептомицин производства “Фармасинтез”, Россия, 10 мг/мл. Реактивы растворяли в PSS непосредственно перед каждым экспериментом. Циклогексимид растворяли в этаноле, цецекоксиб и глибенкламид – в ДМСО и перед экспериментом добавляли необходимое количество концентрата в PSS. Этанол в разведении 1/2000 и ДМСО в разведении 1/1000 не вызывали статистически значимых изменений параметров сократительной активности полосок капсулы ЛУ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel и InStat (GraphPad Software), версия 3.1. Нормальность распределения полученных данных была подтверждена посредством использования критерия Шапиро–Уилка. Результаты исследования представлены в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки ($M \pm m$). Для сравнения данных использовали *t*-критерий Стьюдента для непарных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ЛУ брыжейки быка второго порядка имели форму слегка уплощенной сферы. Их диаметр в среднем составил 26.3 ± 2.4 мм. Толщина капсулы ЛУ без субкапсулярного синуса составляла от 218 до 263 мкм, средняя ширина субкапсулярного синуса – 48.3 ± 4.4 мкм.

На первом этапе мы оценили сократительную активность полосок капсулы брыжеечных ЛУ быка, инкубированных в среде F-10 Ham. Полоски капсулы контроль-

ной группы, так же, как и свежие, доставленные в лабораторию в течение часа после забоя животных, при определенном натяжении генерировали фазные сокращения, амплитуда которых значительно изменялась при увеличении длины полосок (рис. 1). Увеличение длины на 0.5 мм сопровождалось небольшой релаксацией, но не приводило к спонтанной сократительной активности. Увеличение натяжения капсулы ЛУ на 1.0 мм запускало спонтанные фазные сокращения небольшой амплитуды. Дальнейшее увеличение длины на 2.0 мм приводило к генерации ритмичных высокоамплитудных фазных сокращений (рис. 1b). При одинаковой длине полоски, обработанные LPS, развивали намного меньшее натяжение по сравнению с полосками контрольной группы. Второе важное отличие заключалось в отсутствии спонтанных фазных сокращений полосок капсулы, обработанных LPS, во всем диапазоне длин. Были зарегистрированы лишь небольшие волны изменения тонуса полосок капсулы с частотой, близкой к частоте спонтанных фазных сокращений полосок контрольной группы (рис. 1c). Реакции полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде с добавлением LPS и циклогексимида, при растяжении не имели достоверных различий при сравнении с полосками капсулы контрольной группы.

Важной особенностью капсулы ЛУ является ее высокая растяжимость, показанная в наших предыдущих работах [19]. В данном исследовании увеличение длины полосок капсулы ЛУ контрольной группы до $0.87 L_0$ не приводило к увеличению силы, с которой полоски сопротивлялись растяжению. Натяжение полосок начинало заметно возрастать при их удлинении более $0.93 L_0$, а при длинах более $1.13 L_0$ график зависимости натяжения от длины становился более крутым (рис. 2a). Реакции полосок капсулы ЛУ, обработанные LPS, заметно отличались. Действие LPS приводило к значительному увеличению растяжимости капсулы ЛУ, график зависимости пассивного натяжения полосок капсулы брыжеечных ЛУ от длины был сдвинут вправо по сравнению с графиком, отражающим состояние полосок капсулы контрольной группы (рис. 2b). Активное натяжение, развиваемое полосками капсулы, обработанными LPS, при длинах более $0.73 L_0$ было достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем полосок контрольной группы ($p < 0.05$). Пассивное и активное натяжение в зависимости от длины полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде с добавлением LPS + циклогексимид, практически не отличались от полосок капсулы контрольной группы.

Модуль упругости полосок капсулы ЛУ контрольной группы и полосок, обработанных LPS, при длинах $0.6-0.8 L_0$ был практически одинаковым, в среднем $(2.2 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ Н/м}^2$. Различие величин модуля упругости полосок капсулы ЛУ разных групп выявлялось при большем растяжении и достигало максимума при длинах $1.0-1.13 L_0$ $(7.3 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ Н/м}^2$ и $(5.2 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ Н/м}^2$ для полосок капсулы контрольной группы и полосок, обработанных LPS, соответственно. Дальнейшее увеличение длины полосок капсулы обеих групп сопровождалось значительным возрастанием модуля упругости, при этом при всех длинах модуль упругости полосок капсулы ЛУ, обработанных LPS, был достоверно ниже по сравнению с полосками капсулы контрольной группы. При длинах полосок капсулы контрольной группы $1.34 L_0$ их модуль упругости достигал $(3.3 \pm 0.4) \times 10^5 \text{ Н/м}^2$, а в полосках, обработанных LPS, составил $(2.9 \pm 0.3) \times 10^5 \text{ Н/м}^2$. Модуль упругости полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде с добавлением LPS + циклогексимид, не имел достоверных различий от аналогичного показателя характеризующего полоски капсулы контрольной группы.

Для выяснения роли гладкомышечных клеток в изменении растяжимости капсулы ЛУ в результате воздействия LPS были проведены эксперименты с добавлением в PSS папаверина. Папаверин приводил к выраженной релаксации полосок капсулы ЛУ контрольной группы (натяжение при длине, равной L_0 уменьшилось с

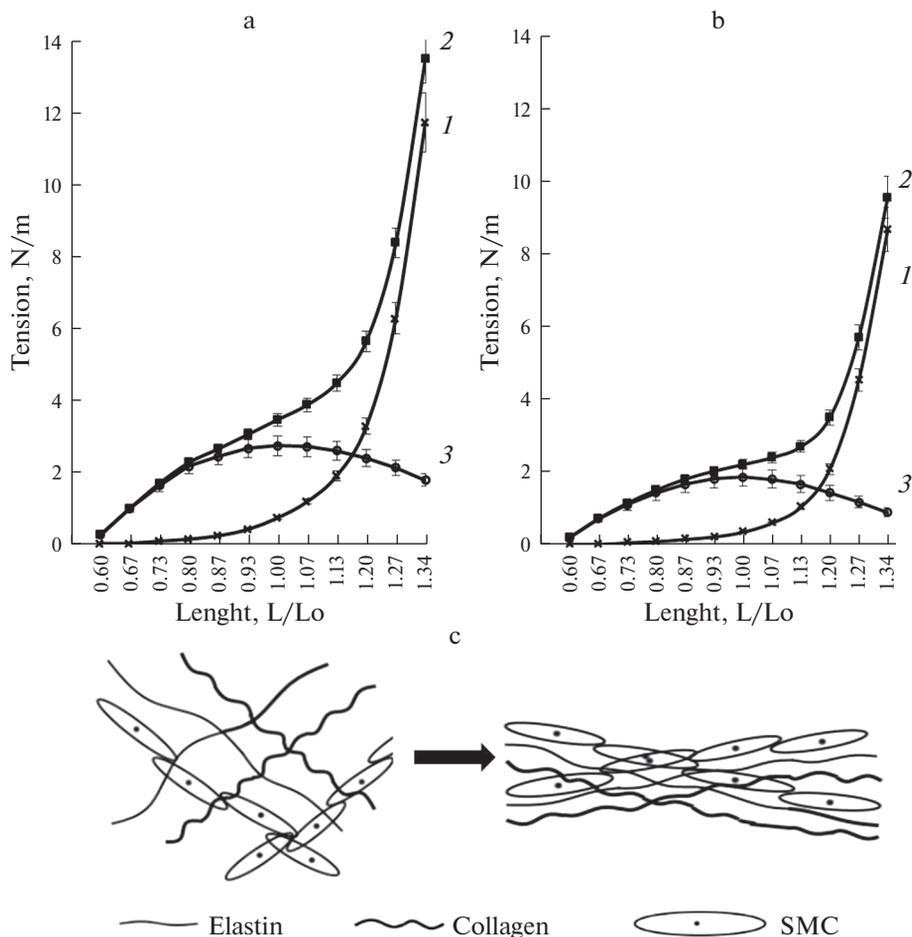


Рис. 2. Зависимость пассивного (1), общего (2) и активного (3) натяжения полосок капсулы брыжеечных ЛУ быка, инкубированных в среде F-10 Ham (a) и в среде F-10 Ham + LPS (b) от длины при тонических сокращениях, вызванных действием активирующего раствора. (c) – схематическое изображение волокон эластина, коллагена и гладкомышечных клеток капсулы ЛУ в нерастянутом состоянии (слева) и при удлинении (справа). Lo – длина полосок капсулы, при которой они генерировали максимальную активную силу. Различия величин пассивного, общего и активного натяжения полосок капсулы брыжеечных ЛУ, инкубированных в среде F-10 Ham и в среде F-10 Ham + LPS достоверны на всех трех графиках начиная с длины 0.8 Lo , $p < 0.05$.

2.72 до 1.19 N/m) и значительно меньшему ослаблению натяжения полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде с LPS (натяжение при длине Lo уменьшилось с 1.86 до 1.02 N/m).

Известно, что воспаление и эндотоксемия при введении LPS сопровождаются значительным повышением концентрации в различных тканях NO, провоспалительных простагландинов и H_2S [24, 25], продуцируемых индуцибельной NO-синтазой (iNOS) и экспрессированными циклооксигеназой-2 (COX 2) и цистатионин-γ-лиазой (CSE) [26, 27]. С учетом этих данных, мы провели исследование возможного участия NO, простагландинов и H_2S в релаксации и ингибировании спонтан-

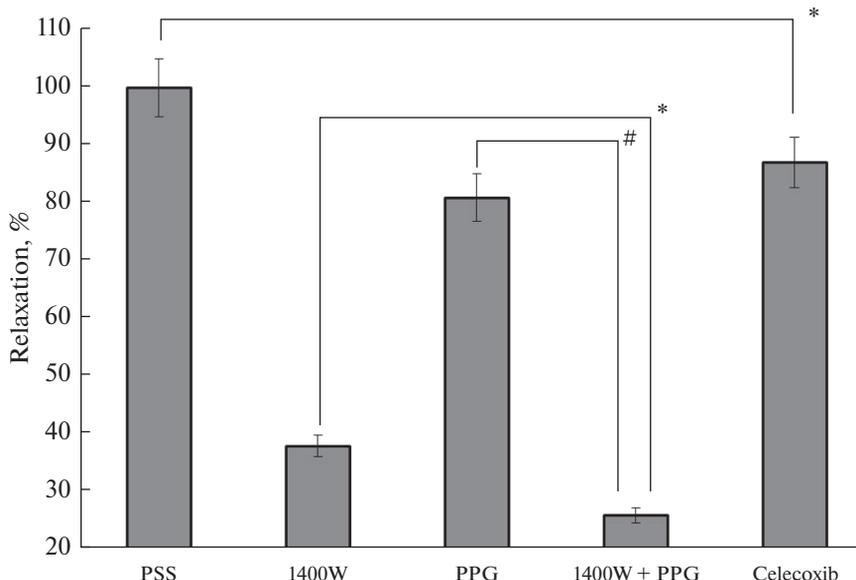


Рис. 3. Релаксация полосок капсулы брыжеечных ЛУ быка, обработанных LPS, на фоне действия ингибиторов ферментов, продуцирующих сигнальные молекулы, обладающие релаксирующим эффектом: PSS – в физиологическом растворе (принята за 100%), 1400W – при действии ингибитора iNOS – 1400W; PPG – при действии ингибитора цистатионин- γ -лиазы – DL-Propargylglycine; 1400W + PPG – при действии ингибиторов iNOS и цистатионин- γ -лиазы; Celecoxib – при действии ингибитора циклооксигеназы 2. Различия достоверны: # – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$.

ной сократительной активности гладкомышечных клеток капсулы ЛУ при действии LPS.

Эксперименты по исследованию возможного участия NO, H₂S и простагландинов в релаксации гладкомышечных клеток капсулы ЛУ при действии LPS проводились по следующей схеме. После стабилизации длину полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде F-10 Ham ($n = 10$) и в среде F-10 Ham + LPS ($n = 16$), увеличивали до Lo и измеряли натяжение, установившееся после завершения релаксации. В полосках капсулы ЛУ контрольной группы среднее пассивное натяжение составило 0.71 ± 0.06 N/m, в полосках, обработанных LPS – 0.38 ± 0.03 N/m, а в полосках, инкубированных в среде F-10 Ham + LPS + циклогексимид – 0.67 ± 0.05 N/m. Разницу между натяжениями полосок капсулы ЛУ первой и второй групп мы считали релаксацией, вызванной воздействием сигнальных молекул, продуцируемых клетками капсулы ЛУ под влиянием LPS.

В последующем в опытах на полосках капсулы ЛУ контрольной группы и инкубированных в среде F-10 Ham + LPS в PSS вводили ингибиторы: 1) 1400W – селективный ингибитор iNOS; 2) DL-Propargylglycine – ингибитор цистатионин- γ -лиазы, 3) celecoxib – высокоселективный ингибитор циклооксигеназы-2. Через 20 мин измеряли силу, с которой полоски оказывали сопротивление растяжению и рассчитывали натяжение. Данные, полученные в этой серии опытов, представлены на рис. 3. Разницу между натяжением полосок капсулы ЛУ контрольной группы и полосок капсулы, обработанных LPS, считали LPS-индуцированной релаксацией, которую принимали за 100%. Применение 1400W значительно уменьшило релаксирующий эффект LPS, в этих опытах релаксация составила 38% от величины ре-

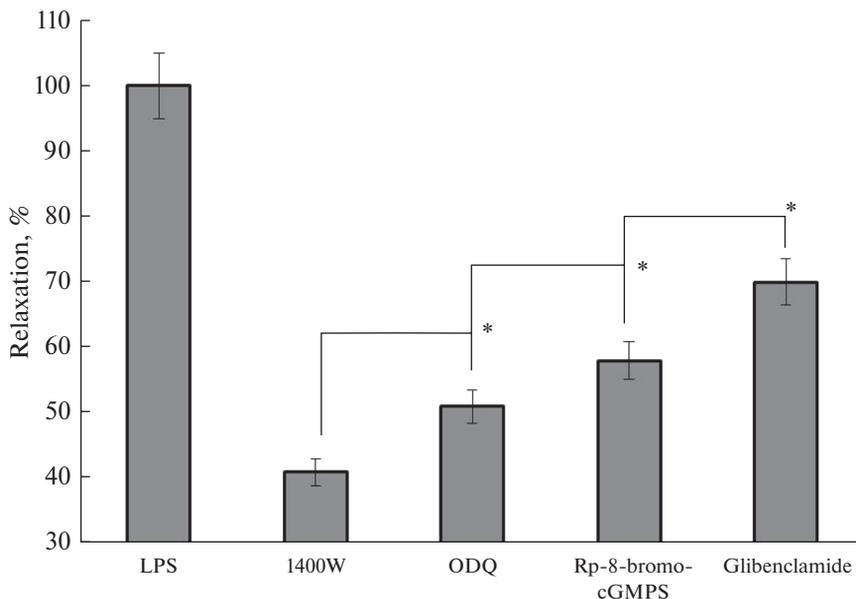


Рис. 4. Релаксация полосок капсулы брыжеечных ЛУ быка, обработанных LPS, при действии ингибиторов различных сигнальных путей. 1400W – ингибитор iNOS, ODQ – ингибитор растворимой гуанилатциклазы, Rp-8-bromo-cGMPS – ингибитор PKG. Релаксация полосок в PSS принята за 100%. * – различия достоверны, $p < 0.05$.

лаксации в PSS. Действие PPG и целекоксиба также сопровождалось достоверным уменьшением релаксации капсулы ЛУ. Изменения натяжения полосок капсулы ЛУ контрольной группы при действии 1400W и целекоксиба были незначительными и недостоверными. В то же время в результате действия PPG натяжение полосок капсулы контрольной группы достоверно возросло на 9% ($p < 0.05$).

Мы также оценили величину релаксирующего эффекта при совместном применении 1400W и PPG. Действие двух ингибиторов приводило к уменьшению релаксации, при этом амплитуда релаксации была меньше суммы амплитуд при раздельном применении 1400W и PPG.

В следующей серии опытов мы оценили роль сигнальной цепочки: NO → растворимая NO-зависимая гуанилатциклаза → цГМФ → PKG → АТФ-чувствительные K^+ -каналы (K_{ATP}) в релаксации полосок капсулы ЛУ, обработанных LPS. Результаты данной серии опытов представлены на рис. 4. Длину полоски капсулы ЛУ устанавливали на уровне Lo. Ингибирование iNOS селективным ингибитором 1400W сопровождалось уменьшением релаксации до 41% от амплитуды релаксации полосок капсулы ЛУ в PSS. При ингибировании sGC амплитуда LPS-индуцированной релаксации составила 51%, а при ингибировании PKG – 58%. Блокирование (K_{ATP})-каналов мембраны гладкомышечных клеток приводило к ослаблению LPS-индуцированной релаксации капсулы ЛУ до 70%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Традиционные определения воспаления сводятся к тому, что этот процесс является реакцией иммунной системы на инфекцию или повреждение [28]. Однако

данные, полученные в последние два десятилетия, показывают, что признаки воспаления регистрируются при самых разных патологических процессах, связанных с нарушением функции тканей (сахарный диабет 2-го типа, атеросклероз, инфаркт миокарда, инсульты, рак и др. патологические состояния [29, 30]). Во всех этих случаях в процессах развития и разрешения воспаления принимает участие лимфатическая система. При воспалении в различных клетках тканей и непосредственно в лимфатических сосудах и ЛУ происходит экспрессия ряда генов, что в итоге приводит к увеличению образования цитокинов и ферментов, продуцирующих большое количество различных сигнальных молекул, изменяющих функции тканей, в т.ч. лимфатических сосудов и ЛУ [31, 32].

В нашей работе в качестве объекта исследования были выбраны брыжеечные ЛУ, которые являются самыми большими ЛУ в организме [33]. ЛУ брыжейки подвергаются массивной антигенной нагрузке (у человека ежедневно с пищей в кишечник поступает около 100 г чужеродного белка, кроме этого, кишечник человека колонизирован примерно 10^{13} бактерий [34]). Через ЛУ брыжейки протекает большой объем лимфы, при этом скорость лимфотока изменяется в значительных пределах (на пике пищеварения и при воспалении кишечника может возрастать в 10 раз [35]). Соответственно, ЛУ брыжейки должны достаточно быстро изменять свои механические и транспортные характеристики в значительных пределах.

ЛУ имеют строение, позволяющее выполнять три взаимозависимых функции: фильтрацию лимфы, индукцию иммунных ответов и активный транспорт лимфы. Во внутренней части ЛУ принято выделять корковое и мозговое вещество. Корковый слой характеризуется скоплением лимфоцитов и является местом, где инициируются адаптивные иммунные реакции, а мозговое вещество характеризуется относительно низкой плотностью клеток и сложной сетью кровеносных сосудов и лимфатических синусов [36, 37]. Морфология третьей структуры – капсулы, хорошо изучена, известно, что основу капсулы составляет соединительнотканый каркас со встроенными в него группами гладкомышечных клеток [13, 15]. При этом функции капсулы ЛУ исследованы недостаточно. Остаются неизученными реакции различных клеток капсулы в процессе воспаления, хотя хорошо известно, что воспаление сопровождается увеличением объема ЛУ в 10–20 раз [12]. Подобное быстрое ремоделирование ЛУ уникально. Несмотря на быстрое увеличение размеров, внутреннее строение ЛУ практически не изменяется, при этом они выполняют свои иммунные функции более эффективно по сравнению с физиологическими условиями.

LPS, являющийся компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий – сильно действующий воспалительный агент, приводящий к образованию в тканях цитокинов и молекул адгезии [38], широко применяется в экспериментах на животных при моделировании воспаления [39]. Образующиеся цитокины активируют в различных клетках множество сигнальных путей, в т.ч. способствующих экспрессии ряда генов, результатом которой является продукция NO [40], простагландинов [41] и H_2S [42], которые в настоящее время принято считать медиаторами воспаления [43]. В нашем исследовании мы изучили LPS-индуцированные механизмы релаксации гладкомышечных клеток капсулы ЛУ, реализуемые с участием NO, простагландинов и H_2S .

При исследовании механических характеристик капсулы ЛУ, обработанных LPS, установлено, что они обладают значительно большей растяжимостью по сравнению с полосками контрольной группы. Пассивное натяжение в полосках контрольной группы при удлинении их до $0.8 L_0$ возрастало незначительно, составляя при этом около 0.12 N/m . В полосках капсулы ЛУ, обработанных LPS, при аналогичном удлинении натяжение не превышало 0.08 N/m . При длине полосок, равной L_0 разница в натяжении возрастала: в контрольной группе этот показатель

составлял 0.71 N/m , в то время, как в полосках, обработанных LPS, натяжение было 0.34 N/m . Действие LPS оказывало выраженное влияние и на активное натяжение полосок капсулы ЛУ: при длине, равной L_0 полоски капсулы контрольной группы развивали активное натяжение 2.72 N/m , а полоски, обработанные LPS — 1.86 N/m . Активное натяжение в сосудах и полых органах создается за счет сокращения гладкомышечных клеток [44], поэтому выраженная разница в величинах натяжения полосок капсулы контрольной группы и обработанных LPS позволила нам предположить, что LPS в капсуле ЛУ оказывает влияние преимущественно на гладкомышечные клетки. Для подтверждения этого предположения мы провели опыты с применением папаверина. Папаверин, вызывающий мощную релаксацию сосудов и внутренних органов [45], в наших экспериментах приводил к выраженной релаксации полосок капсулы ЛУ в контроле и небольшому ослаблению натяжения полосок капсулы, инкубированных в среде с LPS. Мы полагаем, что слабая реакция на папаверин полосок капсулы ЛУ, обработанных LPS, объясняется тем, что гладкомышечные клетки капсулы, подвергавшиеся воздействию LPS и образующихся под его воздействием сигнальных молекул, уже находятся в состоянии расслабления и в связи с этим применение экзогенного вазодилатора малоэффективно.

Важным параметром, характеризующим механические свойства объектов является модуль упругости Юнга. Мы определили эффективный модуль упругости полосок капсулы ЛУ при различной длине. В полосках капсулы ЛУ контрольной группы и полосках, обработанных LPS, при длинах $0.6\text{--}0.8 L_0$ их модуль упругости был практически одинаковым, различие появлялось при большем растяжении и достигало максимума при длине L_0 . Рассчитанный модуль упругости полосок капсулы ЛУ представляется очень низким, однако полученные нами величины близки к данным, зарегистрированным на лимфатических сосудах. Так, в исследовании Azuma и соавт. [39] окружный модуль упругости брыжеечных лимфатических сосудов быка находился в пределах $4.2 \times 10^3\text{--}2.7 \times 10^4 \text{ Н/м}^2$. Мы полагаем, что низкая величина модуля упругости капсулы ЛУ объясняется особенностями ее строения (неупорядоченное расположение волокон эластина и коллагена, отсутствие эластических мембран и разнонаправленная ориентация пучков гладкомышечных клеток) [16]. По-видимому, на первых этапах растяжения капсулы происходит изменение направления волокон эластина и коллагена (рис. 2с), и лишь при дальнейшем удлинении растяжению начинают подвергаться гладкомышечные клетки, что приводит к значимому возрастанию модуля упругости и появлению достоверных различий этого показателя при сравнении полосок контрольной группы и обработанных LPS. При длинах полосок капсулы $L > L_0$ в процесс сопротивления растяжению дополнительно вовлекаются волокна эластина и коллагена, что сопровождается значительным возрастанием модуля упругости.

При исследовании полосок капсулы ЛУ, инкубированных в среде с LPS и циклогексимидом, было показано, что их механические характеристики (и в частности активное натяжение) практически не отличаются от характеристик полосок контрольной группы. Поскольку циклогексимид является ингибитором синтеза белка [46], то эти данные являются подтверждением, что воздействие LPS на гладкомышечные клетки капсулы ЛУ опосредовано сигнальными молекулами, продуцируемыми ферментами, экспрессированными под влиянием LPS и которые в физиологических условиях отсутствуют или их концентрация очень низкая. С учетом этих данных мы провели ряд экспериментов по изучению механизмов релаксирующего эффекта LPS на гладкомышечные клетки капсулы ЛУ.

Известно, что одной из основных транскрипционных мишеней LPS является iNOS. В физиологических условиях iNOS в клетках отсутствует и экспрессируется только тогда, когда клетка индуцируется, как правило, провоспалительными цито-

кинами и/или LPS. Появление в цитоплазме клеток этого индуцируемого фермента приводит к образованию NO, ключевого медиатора иммунной активации и воспаления [47]. iNOS не требует активации и вырабатывает значительное количество NO, которое сохраняется в тканях до инактивации фермента [48]. Ранее iNOS была обнаружена в различных клетках, в т.ч. в эндотелиальных и мышечных клетках лимфатических сосудов, в которых максимальная концентрация iNOS достигалась через 6 ч инкубации с LPS [49].

На первом этапе мы оценили участие iNOS в LPS-индуцированной релаксации капсулы ЛУ. Ингибирование iNOS посредством добавления в раствор высоко-селективного ингибитора – 1400W приводило к значительному уменьшению LPS-индуцированной релаксации капсулы ЛУ, амплитуда релаксации составила 41% от LPS-индуцированной релаксации в PSS (рис. 4). В аналогичных опытах на полосках капсулы ЛУ, не подвергавшихся действию LPS, 1400W не приводил к значимым изменениям натяжения полосок. Полученные данные дают основание для заключения о том, что одной из сигнальных молекул, образующихся в капсуле ЛУ при действии LPS, является NO, продуцируемый iNOS. Поскольку механизм действия NO, продуцируемого iNOS в капсуле ЛУ, практически не изучен, в последующих экспериментах мы исходили из классических представлений о действии NO в гладкомышечных клетках кровеносных [50] и лимфатических сосудов [51]: NO активирует в гладкомышечных клетках растворимую гуанилатциклазу (sGC), что приводит к образованию цГМФ (сGMP), активации протеинкиназы G (PKG) и открыванию K_{ATP} -каналов. Развивающаяся при этом гиперполяризация мембраны гладкомышечных клеток приводит к их расслаблению [52].

ODQ, являющийся селективным ингибитором чувствительной к NO sGC, приводил к значительному ослаблению LPS-индуцированной релаксации капсулы ЛУ (релаксация составила 51% от величины LPS-индуцированной релаксации в PSS). В свою очередь, ингибирование PKG посредством добавления в PSS Rp-8-bromosGMPs также изменяло величину LPS-индуцированной релаксации капсулы ЛУ, в этом случае релаксация была достоверно больше по сравнению с эффектами 1400W и ODQ. На фоне глибенкламида – блокатора K_{ATP} -каналов, релаксация капсулы была большей по сравнению с эффектами ингибиторов sGC и PKG. На основании этих данных мы предполагаем, что в гладкомышечных клетках капсулы ЛУ при экспрессии iNOS и значительном повышении концентрации NO кроме сигнальной цепи $NO \rightarrow sGC \rightarrow PKG \rightarrow K_{ATP}$ -каналы, функционируют еще несколько механизмов релаксации. В частности, достоверное различие амплитуд релаксации капсулы ЛУ, обработанных LPS, при ингибировании iNOS и sGC дает основания считать, что NO оказывает непосредственное влияние на другие регуляторные механизмы в гладкомышечных клетках, возможно, посредством активации ВКСа-каналов мембраны [53]. Помимо этого, различие величин релаксации при ингибировании sGC и PKG позволяет предположить, что сGMP в гладкомышечных клетках капсулы ЛУ не только активирует PKG, но и изменяет активность некоторых регуляторных белков, например посредством дефосфорилирования легкой цепи миозина, как это было обнаружено в кровеносных сосудах [54]. И наконец, различие амплитуд релаксации при ингибировании PKG и блокировании K_{ATP} -каналов свидетельствует о том, что в гладкомышечных клетках капсулы ЛУ PKG не только открывает K_{ATP} -каналы, но действует и на другие регуляторные системы, например, может фосфорилировать потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы мембраны или ингибировать киназу легкой цепи миозина, как это было установлено в гладкомышечных клетках других тканей [55, 56].

Ингибирование iNOS в наших экспериментах уменьшало, но не предотвращало LPS-индуцированную релаксацию капсулы ЛУ, что послужило основанием для

поиска других сигнальных молекул, образующихся в капсуле ЛУ под действием LPS и оказывающих релаксирующий эффект. В соответствии с классическими представлениями, в процессе воспаления в тканях экспрессируется COX 2, под действием которой и соответствующих синтаз арахидоновая кислота трансформируется в простагландины, оказывающие непосредственное воздействие на гладкомышечные клетки [57]. Простагландины играют решающую роль в физиологических и патофизиологических процессах, они активно участвуют в воспалительном процессе. Было установлено, что клетки стенки ЛС непосредственно продуцируют простагландины [58], и в частности ЛС ноги человека и брыжейки быков синтезируют PGE₂ и простаглицлин [1, 59]. В нашей работе добавление в PSS ингибитора COX 2, целекоксиба, приводило к возрастанию натяжения капсулы ЛУ, обработанных LPS, но не оказывало значимого влияния на натяжение полосок капсулы контрольной группы. Разница между величинами натяжения полосок капсулы, обработанных LPS в PSS и при добавлении целекоксиба, составила 12% ($p < 0.05$). На основании этих результатов мы полагаем, что часть релаксирующего эффекта LPS на капсулу ЛУ реализуется за счет производства простагландинов. Мы не проводили идентификацию конкретных простагландинов, но с учетом того, что в эндотелии ЛС при воспалении образуются PGE₂ и простаглицлин [60, 61] и общего происхождения эндотелии лимфатических сосудов и ЛУ [62], мы полагаем, что под действием LPS в клетках капсулы ЛУ экспрессируется COX 2, что ведет к образованию PGE₂ и простаглицлина, которые оказывают релаксирующий эффект на гладкомышечные клетки капсулы ЛУ.

В заключительной серии экспериментов мы исследовали возможное участие H₂S в LPS-индуцированной релаксации капсулы ЛУ. H₂S является одной из трех известных газообразных сигнальных молекул или “газотрансмиттеров”, играющих важную роль в сердечно-сосудистой и других системах в физиологических и патофизиологических условиях [63]. Установлено, что H₂S, как правило, оказывает сосудорасширяющее действие посредством регуляции сигнального пути sGC → PKG [64] или через K_{ATP}-каналы [65]. Доклинические и клинические исследования показали, что в тканях H₂S преимущественно синтезируется ферментами – цистатионин-γ-лиазой (CSE), цистатионин-β-синтазой и 3-меркаптосульфуртрансферазой. В сердечно-сосудистой системе важнейшим H₂S-образующим ферментом является CSE [66]. В капсуле ЛУ основным ферментом, продуцирующим H₂S, также является CSE [46, 67]. Учитывая эти данные, в наших опытах мы применяли ингибитор CSE–DL-Propargylglycine.

Действие на протяжении 20 мин PPG на полоски капсулы ЛУ, обработанные LPS, сопровождалось увеличением их натяжения (или уменьшением релаксации) на 19% (рис. 3). Ослабление LPS-индуцированной релаксации капсулы ЛУ при действии PPG дает основания предположить, что при моделировании воспаления в капсуле ЛУ образуется H₂S, который оказывает релаксирующий эффект на гладкомышечные клетки капсулы. Ранее было показано, что при сепсисе значительно увеличивается концентрация мРНК CSE в печени у мышей [68], повышение активности CSE выявлено и при воспалительных заболеваниях кишечника [69]. Установлено также, что действие LPS повышает H₂S-синтезирующую функцию в макрофагах человека [70]. Мы полагаем, что значительное возрастание доли релаксации, осуществляющейся за счет действия H₂S в полосках капсулы ЛУ, обработанных LPS, по сравнению с полосками капсулы контрольной группы дает основания для заключения об экспрессии в клетках капсулы ЛУ под действием LPS или образующихся цитокинов H₂S-продуцирующих ферментов, в частности CSE. По-

вышенная продукция H_2S приводит к увеличению LPS-индуцированной релаксации капсулы ЛУ.

Релаксирующее действие H_2S и механизмы его действия на гладкомышечные клетки капсулы ЛУ в физиологических условиях были изучены нами ранее [67]. Было установлено, что в капсуле ЛУ релаксирующий эффект H_2S реализуется за счет ингибирования в гладкомышечных клетках фосфодиэстеразы и открывания K_{ATP} -каналов, что ведет к гиперполяризации мембраны и расслаблению гладкомышечных клеток. В данном исследовании на полосках капсулы ЛУ, обработанных LPS, получены новые данные, которые демонстрируют взаимодействие NO и H_2S в процессе реализации релаксирующего эффекта. Ингибирование CSE посредством добавления PPG в PSS сопровождалось ослаблением релаксации на 19%. В то же время в полосках капсулы ЛУ, у которых было заблокировано производство NO, подавление синтеза H_2S с помощью PPG приводило к ослаблению релаксации лишь на 10%. Т.е. непосредственный релаксирующий эффект H_2S в отсутствие NO в капсуле ЛУ составлял 10%, а при наличии NO H_2S -опосредованное расслабление капсулы ЛУ возрастало до 19% от LPS-индуцируемой релаксации. Полученные данные позволяют предположить, что эндогенный H_2S в капсуле ЛУ так же, как и в других тканях, взаимодействует с NO. Результатом этого взаимодействия могут быть сложные метаболиты NO (нитрозоперсульфид, сульфенилнитрит и др.), которые оказывают непосредственный релаксирующий эффект на гладкомышечные клетки [71, 72] или усиливают биологическое действие NO, оказывая влияние на NO-опосредуемый сигнальный путь $NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG$, стабилизируя sGC или образуя 8-SH-cGMP, форму cGMP, более устойчивую к фосфодиэстеразе [73]. Таким образом, H_2S в клетках капсулы брыжеечных ЛУ быка, обработанных LPS, так же, как и в кровеносных сосудах [74] с одной стороны является важным независимым эффектором, приводящим к релаксации капсулы ЛУ, а с другой – усилителем NO-опосредованной релаксации.

В заключение, полученные в нашем исследовании данные, показывают, что при моделировании воспаления растяжимость капсулы ЛУ возрастает вследствие ингибирования сократительной функции гладкомышечных клеток, входящих в состав капсулы. Показано, что LPS вызывает экспрессию в клетках капсулы ЛУ индуцибельной NO-синтазы, циклооксигеназы 2 и цистатионин- γ -лиазы. Продуцируемые этими ферментами NO, простагландины и H_2S не только угнетают фазную сократительную функцию гладкомышечных клеток капсулы, но и приводят к существенному снижению тонуса. Продуцируемый в значительном количестве NO не ограничивается активацией классического сигнального пути $NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG \rightarrow K_{ATP}$ – каналы гладкомышечных клеток, но и, по-видимому, оказывает непосредственное влияние на другие регуляторные механизмы. Впервые показано, что H_2S , синтезированный цистатионин- γ -лиазой в капсуле ЛУ, обработанной LPS, не только оказывает непосредственный релаксирующий эффект, но и усиливает NO-опосредованную релаксацию гладкомышечных клеток капсулы ЛУ. Таким образом, результаты данного исследования предоставляют доказательства, что уже на ранней стадии LPS-индуцируемого воспаления в капсуле брыжеечных ЛУ быка происходят изменения, направленные на создание условий для увеличения размеров ЛУ и накопления иммунных клеток.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 22-25-00108.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРА:

Идея работы, планирование экспериментов, проведение опытов, анализ результатов, написание и редактирование текста статьи (Г.И.Л.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Breslin JW, Yang Y, Scallan JP, Sweat RS, Adderley SP, Murfee WL* (2018) Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology. *Compr Physiol* 9(1): 207–299.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c180015>
2. *Лобов ГИ* (2022) Лимфатическая система в норме и при патологии. *Успехи физиол наук* 53: 15–38. [*Lobov GI* (2022) The lymphatic system in normal and pathological conditions. *Progress Physiol Sci* 53: 15–38. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179822020060>
3. *Борисов АВ* (2005) Функциональная анатомия лимфангиона. *Морфология* 128(6):18–27. [*Borisov AV* (2005) Functional anatomy of lymphangion. *Morfologiya* 128(6): 18–27. (In Russ)].
4. *Орлов РС, Лобов ГИ* (1984) Механизм действия внутрисосудистого давления на электрическую и сократительную активность лимфангионов. *Физиол журн СССР им ИМ Сеченова* 70(12): 1636–1644. [*Orlov RS, Lobov GI* (1984) Mechanism of action of intravascular pressure on the electrical and contractile activity of lymphangions. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova* 70(12): 1636–1644. (In Russ)].
5. *Hokari R, Tomioka A* (2021) The role of lymphatics in intestinal inflammation. *Inflamm Regen* 41(1): 25.
<https://doi.org/10.1186/s41232-021-00175-6>
6. *Randolph GJ, Ivanov S, Zinselmeyer BH, Scallan JP* (2017) The Lymphatic System: Integral Roles in Immunity. *Annu Rev Immunol* 35: 31–52.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055354>
7. *Trevaskis NL, Kaminskas LM, Porter CJ* (2015) From sewer to saviour – targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity. *Nat Rev Drug Discov* 14: 781–803.
<https://doi.org/10.1038/nrd4608>
8. *Cakala-Jakimowicz M, Kolodziej-Wojnar P, Puzjanowska-Kuznicka M* (2021) Aging-Related Cellular, Structural and Functional Changes in the Lymph Nodes: A Significant Component of Immunosenescence? An Overview. *Cells* 10(11): 3148.
<https://doi.org/10.3390/cells10113148>
9. *von Andrian UH, Mempel TR* (2003) Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3: 867–878.
<https://doi.org/10.1038/nri1222>
10. *Mendoza A, Fang V, Chen C, Serasinghe M, Verma A, Muller J, Chaluvadi VS, Dustin ML, Hla T, Elemento O, Chipuk JE, Schwab SR* (2017) Lymphatic endothelial S1P promotes mitochondrial function and survival in naive T cells. *Nature* 546(7656): 158–161.
<https://doi.org/10.1038/nature22352>
11. *Gregory JL, Walter A, Alexandre YO, Hor JL, Liu R, Ma JZ, Devi S, Tokuda N, Owada Y, Mackay LK, Smyth GK, Heath WR, Mueller SN* (2017) Infection Programs Sustained Lymphoid Stromal Cell Responses and Shapes Lymph Node Remodeling upon Secondary Challenge. *Cell Rep* 18(2): 406–418.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.03>
12. *Acton SE, Reis e Sousa C* (2016) Dendritic cells in remodeling of lymph nodes during immune responses. *Immunol Rev* 271(1): 221–229.
<https://doi.org/10.1111/imr.12414>
13. *Faroon OM, Henry RW, al-Bagdadi FK* (1987) Smooth muscle distribution in the capsule and trabeculae of the caprine superficial cervical lymph node. *Histol Histopathol* 2(3): 313–315.
14. *Lobov GI, Pan'kova MN* (2011) Mechanical properties of lymph node capsule. *Bull Exp Biol Med* 151(1): 5–8.
<https://doi.org/10.1007/s10517-011-1246-7>
15. *Lobov GI, Pan'kova MN, Dvoretzky DP, Sergeev IV* (2010) Characteristic of the active and passive mechanical properties of the lymph node capsule. *Dokl Biol Sci* 434: 310–312.
<https://doi.org/10.1134/S0012496610050054>
16. *Folse DS, Beathard GA, Granholm NA* (1975) Smooth muscle in lymph node capsule and trabeculae. *Anat Rec* 183(4): 517–521.

17. *Castenholz A* (1990) Architecture of the lymph node with regard to its function. *Curr Top Pathol* 84 (Pt 1): 1–32.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-75519-4_1
18. *Лобов ГИ, Панькова МН, Абдрешов СН* (2015) Транспортная функция лимфатических узлов у молодых и старых животных. *Успехи геронтол* 28(4): 681–686. [*Lobov GI, Pan'kova MN, Abdreshov SN* (2015) Transport function of the lymph nodes in young and old animals. *Adv Gerontol* 28(4): 681–686. (In Russ)].
19. *Lobov GI, Kosareva ME* (2022) Comparative characteristics of the mechanical properties of the capsule of the mesenteric lymph nodes young and old bulls. *J Evol Biochem Phys* 58: 1353–1366.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022050076>
20. *Иосифов ГМ* (1914) Лимфатическая система человека с описанием аденоидов и органов движения лимфы. Томск. Изд. Томского Университета. 274 с. [*Iosifov GM* (1914) The human lymphatic system with a description of the adenoids and organs of lymphatic movement. Tomsk. Ed. Tomsk University. 274 p. (In Russ)].
21. *Novkovic M, Onder L, Cheng HW, Bocharov G, Ludewig B* (2018) Integrative Computational Modeling of the Lymph Node Stromal Cell Landscape. *Front Immunol* 9: 2428.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02428>
22. *Pastukhova IA* (1986) Myocytes of the inguinal lymph nodes. *Arkh Anat Gistol Embriol* 90(6): 32–37.
23. *Suba EA, McKenna TM, Williams TJ* (1992) *In vivo* and *in vitro* effects of endotoxin on vascular responsiveness to norepinephrine and signal transduction in the rat. *Circ Shock* 36(2): 127–133.
24. *Ricciotti E, FitzGerald GA* (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5): 986–1000.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>
25. *El-Haj L, Bestle MH* (2017) Nitric oxide and sepsis. *Ugeskr Laeger* 179(44):V01170086.
26. *Boncoeur É, Bouvet GF, Migneault F, Tardif V, Ferraro P, Radzioch D, de Sanctis JB, Eidelman D, Govindaraju K, Dagenais A, Berthiaume Y* (2013) Induction of nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide is mediated by calcium-dependent PKC α - β 1 in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305(2): L175–184.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00295.2012>
27. *Wang M, Guo Z, Wang S* (2014) The binding site for the transcription factor, NF- κ B, on the cystathionine γ -lyase promoter is critical for LPS-induced cystathionine γ -lyase expression. *Int J Mol Med* 34(2): 639–645.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1788>
28. *Medzhitov R* (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203): 428–435.
<https://doi.org/10.1038/nature07201>
29. *Coussens LM, Werb Z* (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860–867.
<https://doi.org/10.1038/nature01322>
30. *Libby P* (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420(6917): 868–874.
<https://doi.org/10.1038/nature01323>
31. *Schwager S, Detmar M* (2019) Inflammation and Lymphatic Function. *Front Immunol* 10: 308.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00308>
32. *Wilting J, Becker J, Buttler K, Weich HA* (2009) Lymphatics and inflammation. *Curr Med Chem* 16(34): 4581–4592.
<https://doi.org/10.2174/092986709789760751>
33. *Houston SA, Cerovic V, Thomson C, Brewer J, Mowat AM, Milling S* (2016) The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunol* 9: 468–478.
<https://doi.org/10.1038/ми.2015.77>
34. *Sender R, Fuchs S, Milo R* (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* 14: e1002533.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
35. *Telinus N, Drewsen N, Pilegaard H, Kold-Petersen H, de Leval M, Aalkjaer C, Hjortdal V, Boedtker DB* (2010) Human thoracic duct *in vitro*: diameter-tension properties, spontaneous and evoked contractile activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(3): H811–818.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01089.2009>
36. *Sainte-Marie G* (2010) The Lymph Node Revisited: Development, Morphology, Functioning, and Role in Triggering Primary Immune Responses. *Anat Rec* 293: 320–337.
<https://doi.org/10.1002/ar.21051>
37. *Kastenmüller W, Torabi-Parizi P, Subramanian N, Lämmermann T, Germain R N* (2012) A Spatially-Organized Multicellular Innate Immune Response in Lymph Nodes Limits Systemic Pathogen Spread. *Cell* 150: 1235–1248.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.021>

38. *Adib-Conquy M, Cavailon JM* (2012) Host inflammatory and anti-inflammatory response during sepsis. *Pathol Biol (Paris)* 60(5): 306–313.
<https://doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.011>
39. *Cavailon JM* (2018) Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicon* 149: 45–53.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.016>
40. *Wolkow PP* (1998) Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm Res* 47(4): 152–166.
<https://doi.org/10.1007/s000110050309>
41. *Ricciotti E, FitzGerald GA* (2011) Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5): 986–1000.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.20744>
42. *Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Bian JS* (2020) Role of Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Link Between Inflammation and Hydrogen Sulfide. *Front Pharmacol* 10: 1568.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01568>
43. *Bhatia M, Gaddam RR* (2021) Hydrogen Sulfide in Inflammation: A Novel Mediator and Therapeutic Target. *Antioxid Redox Signal* 34(17): 1368–1377.
<https://doi.org/10.1089/ars.2020.8211>
44. *Clark JF, Radda GK, Boehm EA* (2000) The effects of anti-hypertensive therapy on the structural, mechanical and metabolic properties of the rat aorta. *J Muscle Res Cell Motil* 21(3): 255–267.
<https://doi.org/10.1023/a:1005646614308>
45. *Rahimi N, Dehpour AR, Javadi-Paydar M, Sohanaki H, Rabbani S, Ansari M, Tafti SH* (2011) Effect of DETA-NONOate and papaverine on vasodilation of human internal mammary artery. *Can J Physiol Pharmacol* 89(12): 945–951.
<https://doi.org/10.1139/y11-092>
46. *Лобов ГИ* (2021) Роль сероводорода в релаксации капсулы лимфатических узлов при ЛПС-индуцированном воспалении. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 107(11): 1372–1384. [*Lobov GI* (2021) The role of hydrogen sulfide in relaxation of the lymph node capsule in LPS-induced inflammation. *Russ Physiol Zhurn im IM Sechenov* 107(11): 1372–1384. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813921110066>
47. *Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB* (2020) Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev* 40(1): 158–189.
<https://doi.org/10.1002/med.21599>
48. *Thiemermann C* (1997) Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol* 29(2): 159–166.
[https://doi.org/10.1016/s0306-3623\(96\)00410-7](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(96)00410-7)
49. *Chen Y, Rehal S, Roizes S, Zhu HL, Cole WC, von der Weid PY* (2017) The pro-inflammatory cytokine TNF- α inhibits lymphatic pumping via activation of the NF- κ B-iNOS signaling pathway. *Microcirculation* 24(3): 10.1111/micc.12364.
<https://doi.org/10.1111/micc.12364>
50. *Muchler SM, Straub AC* (2015) Compartmentalized nitric oxide signaling in the resistance vasculature. *Nitric Oxide* 49: 8–15.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.05.003>
51. *Mathias R, von der Weid PY* (2013) Involvement of the NO-cGMP-K(ATP) channel pathway in the mesenteric lymphatic pump dysfunction observed in the guinea pig model of TNBS-induced ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304(6): G623–634.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00392.2012>
52. *Derbyshire ER, Marletta MA* (2012) Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem* 81: 533–559.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-050410-100030>
53. *Lang RJ, Harvey JR, McPhee GJ, Klemm MF* (2000) Nitric oxide and thiol reagent modulation of Ca²⁺-activated K⁺ (BKCa) channels in myocytes of the guinea-pig taenia caeci. *J Physiol* 525(2): 363–376.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00363.x>
54. *Murad F, Waldman S, Molina C, Bennett B, Leitman D* (1987) Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res* 249: 65–76.
55. *Waldman S.A, Murad F* (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharm. Rev* 39: 163–196.
56. *da Silva GM, da Silva MC, Nascimento DVG, Lima Silva EM, Gouvêa FFF, de França Lopes LG, Araújo AV, Ferraz Pereira KN, de Queiroz TM* (2021) Nitric Oxide as a Central Molecule in Hypertension: Focus on the Vasorelaxant Activity of New Nitric Oxide Donors. *Biology (Basel)* 10(10): 1041.
<https://doi.org/10.3390/biology10101041>

57. *Bishop-Bailey D, Hla T, Mitchell JA* (1999) Cyclo-oxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Int J Mol Med* 3(1): 41–48.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.3.1.41>
58. *Chan AK, Vergnolle N, Hollenberg MD, von der Weid P-Y* (2004) Proteinase-activated receptor 2 modulates guinea-pig mesenteric lymphatic vessel pacemaker potential and contractile activity. *J Physiology* 560: 563–576.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.071399>
59. *Kashiwagi S, Hosono K, Suzuki T, Takeda A, Uchinuma E, Majima M* (2011) Role of COX-2 in lymphangiogenesis and restoration of lymphatic flow in secondary lymphedema. *Lab Invest* 91(9): 1314–1325.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.84>
60. *Rehal S, Blanckaert P, Roizes S, von der Weid PY* (2009) Characterization of biosynthesis and modes of action of prostaglandin E2 and prostacyclin in guinea pig mesenteric lymphatic vessels. *Br J Pharmacol* 158(8): 1961–1970.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00493.x>
61. *Sinzinger H, Kaliman J, Mannheimer E* (1994) Arachidonic acid metabolites of human lymphatics. *Lymphology* 17(2): 39–42.
62. *Blum KS, Pabst R* (2006) Keystones in lymph node development. *J Anat* 209(5): 585–595.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00650.x>
63. *Kolluru GK, Shackelford RE, Shen X, Dominic P, Kevil CG* (2022) Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease. *Nat Rev Cardiol* 5: 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41569-022-00741-6>
64. *Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Zaid A, Giannogonas P, Cantalupo A, Dhayade S, Karalis KP, Wang R, Feil R, Cirino G* (2012) cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. *PLoS One* 7(12): e53319.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053319>
65. *Elies J, Scragg JL, Huang S, Dallas ML, Huang D, MacDougall D, Boyle JP, Gamper N, Peers C* (2014). Hydrogen sulfide inhibits Cav3.2 T-type Ca²⁺ channels. *FASEB J* 28(12): 5376–5387.
<https://doi.org/10.1096/fj.14-257113>
66. *Wang R* (2002) Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16: 1792–1798.
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0211hyp>
67. *Lobov GI* (2020) Relaxing Effect of Hydrogen Sulfide on Isolated Bovine Mesenteric Lymph Nodes. *Bull Exp Biol Med* 169(2): 192–196.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04848-z>
68. *Zhang H, Zhi L, Moore PK, Bhatia M* (2006) Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(6): L1193–L201.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00489.2005>
69. *Zhu Z, Chambers S, Zeng Y, Bhatia M* (2022) Gases in Sepsis: Novel Mediators and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* 23(7): 3669.
<https://doi.org/10.3390/ijms23073669>
70. *Badiei A, Gieseg S, Davies S, Izani Othman M, Bhatia M* (2015) LPS Up-Regulates Cystathionine γ -Lyase Gene Expression in Primary Human Macrophages via NF- κ B/ERK Pathway. *Inflamm Allergy Drug Targets* 14(2): 99–104.
<https://doi.org/10.2174/1871528114666151201201719>
71. *Huang YQ, Jin HF, Zhang H, Tang CS, Du JB* (2021) Interaction among Hydrogen Sulfide and Other Gasotransmitters in Mammalian Physiology and Pathophysiology. *Adv Exp Med Biol* 1315: 205–236.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-0991-6_9
72. *Berenyiova A, Grman M, Mijuskovic A, Stasko A, Misak A, Nagy P, Ondriasova E, Cacanyiova S, Brezova V, Feelisch M, Ondrias K* (2015) The reaction products of sulfide and S-nitrosoglutathione are potent vasorelaxants. *Nitric Oxide* 46: 123–130.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.12.008>
73. *Nishida M, Toyama T, Akaike T* (2014) Role of 8-nitro-cGMP and its redox regulation in cardiovascular electrophilic signaling. *J Mol Cell Cardiol* 73: 10–17.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.02.003>
74. *Szabo C* (2017) Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol* 312: C3–C15.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00282.2016>

Contractile Function of the Capsule of the Bovine Mesenteric Lymph Nodes at the Early Stage of Inflammation

G. I. Lobov*

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

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

Inflammation is detected not only in infections or injuries, but also in many other pathological processes associated with impaired tissue function, such as type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis, myocardial infarction, etc. In all cases, the lymphatic system is involved in the development and resolution of inflammation, and, in particular, the lymph nodes (LN), which receive tissue degradation products, bacterial fragments, antigen-presenting cells, and various cytokines from the focus of inflammation. The aim of the work was to study the mechanisms of inhibition of the contractile function of the bovine mesenteric LN capsule, which contribute to LN remodeling at an early stage of inflammation. Isolated LN capsule strips treated with lipopolysaccharide (LPS) were examined in a myograph. The data obtained show that under the influence of LPS, the extensibility of the LN capsule increases due to the inhibition of the contractile function of the smooth muscle cells that make up the capsule. It has been established that the action of LPS leads to the expression of inducible NO-synthase, cyclooxygenase 2, and cystathionine- γ -lyase in the cells of the LN capsule. The NO, prostaglandins and H₂S produced by these enzymes not only inhibit the phase contractile function of the smooth muscle cells of the capsule, but also lead to a significant decrease in tone. NO produced in a significant amount activates the NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG \rightarrow K_{ATP} signaling pathway of smooth muscle cells; in addition, it directly affects other regulatory mechanisms. It has been shown for the first time that H₂S synthesized by cystathionine- γ -lyase in the LPS-treated LN capsule not only has a direct relaxing effect, but also enhances the NO-mediated relaxation of the smooth muscle cells of the capsule. Thus, the results of this study provide evidence that already at an early stage of LPS-induced inflammation, changes occur in the capsule of bovine mesenteric LNs aimed at creating conditions for increasing the size of the LNs and accumulating immune cells.

Keywords: lymph node, capsule, smooth muscle cells, lipopolysaccharide, inflammation

МЕТОДИЧЕСКАЯ СТАТЬЯ

**ПРОСТОЙ РЕГУЛЯТОР ПОДАЧИ CO₂ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИНКУБАТОРА
КЛЕТОК ИЗ ДОСТУПНЫХ КОМПОНЕНТОВ¹**

© 2022 г. М. А. Суслов¹, Г. В. Сибгатуллина¹, Д. В. Самигуллин^{1, 2, *}

¹Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

²Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева,
Казань, Россия

*E-mail: samid75@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2022 г.

После доработки 20.10.2022 г.

Принята к публикации 24.10.2022 г.

В настоящей работе описывается система автоматизации подачи CO₂ для лабораторного инкубатора клеток, которая позволит изготовить инкубатор с контролируемым уровнем CO₂ из доступного лабораторного оборудования. Регулятор CO₂ сконструирован в лабораторных условиях из простых компонентов с использованием аппаратно-программной платформы Arduino и может быть интегрирован в лабораторный термостат. В статье описаны результаты тестовых экспериментов на культурах клеток, которые демонстрируют работоспособность конструкции. Поскольку CO₂-инкубаторы являются важным и распространенным научным оборудованием, представленная в статье информация о нашей разработке будет полезна широкому кругу исследователей.

Ключевые слова: CO₂-инкубатор, регулятор концентрации CO₂, культуры клеток

DOI: 10.31857/S0869813922120135

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные культуры в последние годы используются для множества различных научных и медицинских исследований. Культивирование стволовых клеток открывает широкие возможности для регенерации поврежденных тканей, восстановлению утраченных органов [1]. В научно-исследовательских целях культивирование клеток позволяет исследовать процессы онтогенеза и взаимодействие между клетками различных тканей [2, 3]. Культивирование различных линий раковых клеток позволяет увеличить эффективность поиска методов и подходов для борьбы с заболеванием раком, вести персонализированное лечение больных, проводить исследования новых лекарственных препаратов [4]. Также клеточные культуры позволяют исследовать взаимодействие наночастиц с клетками [5]. Клетки в культуре легко доступны для различных манипуляций и прижизненного наблюдения с помощью микроскопа. Для выращивания культур клеток используют биологические инкубаторы. Инкубаторы применяются в научных и медицинских лабораториях для культивирования бактерий и клеток различных тканей при контроле содержания углекислого газа, определенном значении температуры и при заданном уровне влажности в инкубаторе. Инкубаторы для бактериальных культур более простые и дешевые приборы и

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0869813922120135 для авторизованных пользователей.

представляют собой простые термостатируемые шкафы. Существует множество конструкций подобных термостатов, и во многих лабораториях имеется подобное оборудование, которое широко применяется в лабораторной работе. Эти инкубаторы отлично подходят для выращивания и различных манипуляций с бактериями. Однако для работы с клетками млекопитающих (например, опухолевыми клетками человека, клетками мыши или крысы и т.д.), требуются инкубаторы, которые контролируют как температуру, так и содержание CO_2 в окружающем воздухе. Поддержание концентрации CO_2 на уровне 5% необходимо для поддержания pH обычных сред для культивирования клеток млекопитающих (например, ДМЕМ) [6]. Цена таких инкубаторов значительна. Задача данного исследования состояла в разработке простой системы контроля подачи CO_2 , которая позволила бы превратить обычный термостат в инкубатор с автоматическим контролем уровня этого газа. Есть несколько публикаций, описывающих сравнительно простые CO_2 -инкубаторы, но они описывают изготовление новых специализированных устройств [7–9]. Здесь мы предлагаем доработать уже имеющееся в лаборатории оборудование, что намного проще, дешевле и не займет много времени. Поскольку CO_2 -инкубаторы являются важным научным оборудованием, представленная в статье информация о нашей разработке будет полезна широкому кругу исследователей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработанная система контроля концентрации CO_2 реализована на базе промышленного CO_2 -инкубатора ULAB модели UT-8050. В исходной комплектации в данной модели отсутствует датчик концентрации CO_2 , а система подачи газа регулируется по определенному алгоритму, исходя из временных промежутков, на которые открывалась дверь инкубатора, без контроля содержания концентрации CO_2 в газовой смеси во внутренней камере инкубатора. Несмотря на установленный уплотнитель на двери инкубатора, в течение суток происходила утечка CO_2 , которую не удавалось скомпенсировать. Это сказывалось на качестве роста клеточных культур. Было решено полностью заменить штатную систему подачи газа. Штатная система термостабилизации была оставлена без изменений, так как она неплохо справлялась со своей задачей.

Основные компоненты системы контроля подачи представлены на рис. 1.

Регулятор концентрации CO_2 в камере инкубатора

В качестве анализатора концентрации CO_2 был использован недисперсионный инфракрасный сенсор MH-Z16 с отдельным интерфейсным адаптером I2C/UART (Winsen, Китай). Ключевыми компонентами датчика являются инфракрасный источник (светодиод), измерительная камера или световая трубка, фильтр длины волны и инфракрасный детектор. Окружающий воздух естественным образом попадает в измерительную камеру, затем концентрация CO_2 в воздухе измеряется электрооптическим путем благодаря поглощению определенной длины волны в инфракрасном спектре. Интенсивность инфракрасного излучения, с которой луч от источника достигает детектора, обратно пропорциональна концентрации CO_2 в измерительной камере датчика. Молекулы других газов не поглощают свет на выбранной длине волны, так что они не могут повлиять на количество света, попадающего на детектор. Данный сенсор CO_2 был выбран исходя из следующих его преимуществ:

1) хорошая селективность и отсутствие зависимости от содержания кислорода, быстрое время отклика (<30 с), достаточно высокая точность (± 50 ppm и длительный срок службы (более 5 лет);

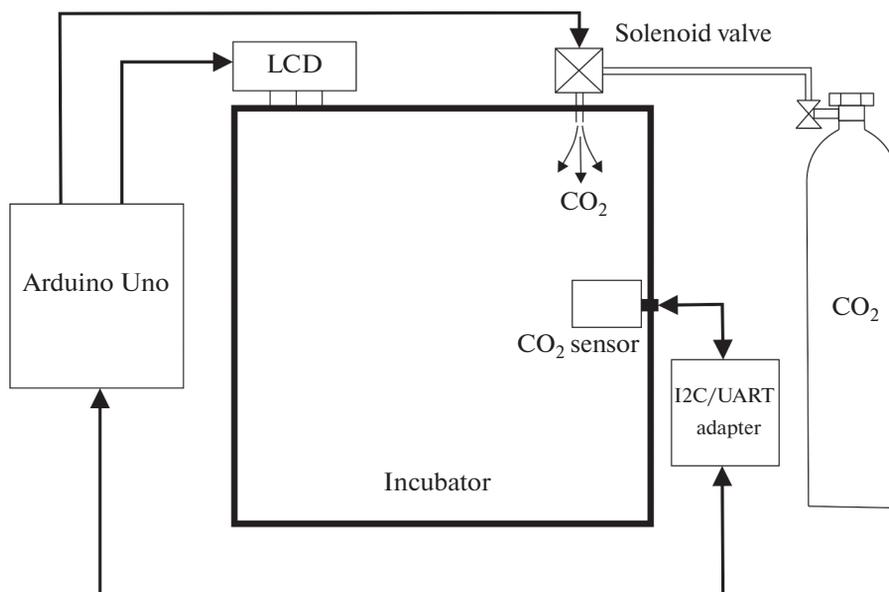


Рис. 1. Общая схема инкубатора с регулятором концентрации CO₂. Аппаратно-программная платформа (Arduino Uno), камера инкубатора (Incubator), жидкокристаллический дисплей (LCD), сенсор CO₂ (CO₂ sensor), адаптер сенсора CO₂ (I2C/UART adapter), электромагнитный клапан (solenoid valve), баллон CO₂ с редуктором.

2) в отличие от химических датчиков CO₂, этот датчик не нуждается в постоянно включенном нагревательном элементе и поэтому имеет низкое энергопотребление;

3) датчик имеет заводскую калибровку и настроен на необходимый диапазон концентраций CO₂ (0–10%), при этом в датчике предусмотрена легкая самостоятельная калибровка, которая осуществляется путем нажатия специальной кнопки на интерфейсном адаптере I2C/UART;

4) инфракрасный сенсор и адаптер I2C/UART изготовлены в виде отдельных блоков, что позволило разместить внутри камеры CO₂-инкубатора непосредственно сам инфракрасный сенсор, а остальную часть, включая соединительные провода, вынести наружу;

5) датчик имеет приемлемый для наших условий эксплуатации диапазон рабочих температур (0–50°C) и влажности (0–95%), а также устойчив к кратковременному повышению температуры в CO₂ инкубаторе до 100°C, необходимому для периодической стерилизации камеры.

Автоматизация контроля концентрации CO₂ в камере инкубатора была реализована на базе аппаратно-программной платформы Arduino Uno R3. Управление датчиком концентрации CO₂ MH-Z16 осуществляется с помощью последовательного интерфейса передачи данных (UART). Данные о концентрации CO₂ в камере инкубатора выводятся на ЖК-дисплей LCD 1602 по шине I2C. При снижении порогового значения концентрации CO₂ в камере, который задается программным путем, производится подача CO₂ из баллона по пневмомагистрали через электромагнитный клапан Burkert 6105 (Fluidcontrolsystems, Германия). Давление на входе электромагнитного клапана устанавливалось при помощи стандартного редуктора на баллоне и составляло 0.05 МПа. Открытие электромагнитного клапана произво-

дится путем подачи на него сигнала с цифрового порта Arduino, усиленного на биполярном транзисторе КТ829А.

Блок-схема автоматизации контроля концентрации CO_2 в камере инкубатора приведена на рис. 1. Программный код для автоматизации контроля концентрации углекислого газа в камере инкубатора представлен в Приложении.

Культура клеток

Для тестирования работы регулятора CO_2 были использованы первичные культуры мотонейронов крысы. Получение культур проводили по методу, описанному нами ранее [10]. Клетки высаживали на культуральные 6-луночные планшеты и выращивали до проведения эксперимента в течение 7 дней в среде ДМЕМ, содержащей феноловый красный.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что оптимальные показатели рН среды для выращивания культивируемых клеток составляют 7.2–7.4 [11]. Повышение или понижение уровня кислотности крайне нежелательно. Для нейтрализации избытка ионов водорода и поддержания оптимального уровня кислотности среды культивирования принято использовать буферную систему на основе бикарбоната натрия. Для поддержания правильного баланса в данной системе необходим CO_2 в концентрации 5–10%.

Бикарбонатная буферная система обеспечивает постоянный уровень рН равновесным соотношением между бикарбонатом натрия (NaHCO_3) в культуральной среде и CO_2 в инкубаторе, при этом она является недорогой и нетоксичной для клеток. В результате повышения концентрации CO_2 в газовой фазе увеличивается количество CO_2 , растворенного в питательной среде, что ведет к росту концентрации H_2CO_3 и понижению рН. Напротив, если концентрация CO_2 газовой фазы снижена, то рН повышается за счет обратной реакции [12, 13]



Для отслеживания изменений рН в процессе культивирования используют феноловый красный – кислотно-основный индикатор, добавляемый в питательные среды. При низком уровне рН феноловый красный приобретает желтую окраску, тогда как при высоких уровнях рН он имеет пурпурный цвет, ярко-красный цвет среды соответствует рН 7.4, оптимальному для культивирования клеток животных [11].

При работе с культивируемыми клетками снижение уровня CO_2 в инкубаторе связано не только с его расходом в ходе вышеупомянутой реакции при активации клеточного метаболизма, но и с его выходом из камеры при открывании дверцы инкубатора. По нашим данным, открытие дверцы на 30 с приводит к снижению содержания CO_2 с исходных 5% до $1.2 \pm 0.1\%$. При установленных настройках регулятора CO_2 восстановление базового уровня CO_2 происходит в среднем за 25 мин (рис. 2а). При дальнейшей работе без открывания дверцы инкубатора базовый уровень поддерживается длительное время (рис. 2б). Процесс восстановления концентрации CO_2 после открытия дверцы можно ускорить программным методом, увеличивая время открывания клапана. В нашем случае 25 мин являлось достаточным временем для установления стационарных условий и точности концентрации CO_2 .

Для проверки работоспособности регулятора CO_2 нами был проведен ряд контрольных экспериментов.

Инкубирование питательных сред в термостате в течение 12 ч при отключенном регуляторе CO_2 не вызывало изменения цвета индикатора (рис. 3а), тогда как при

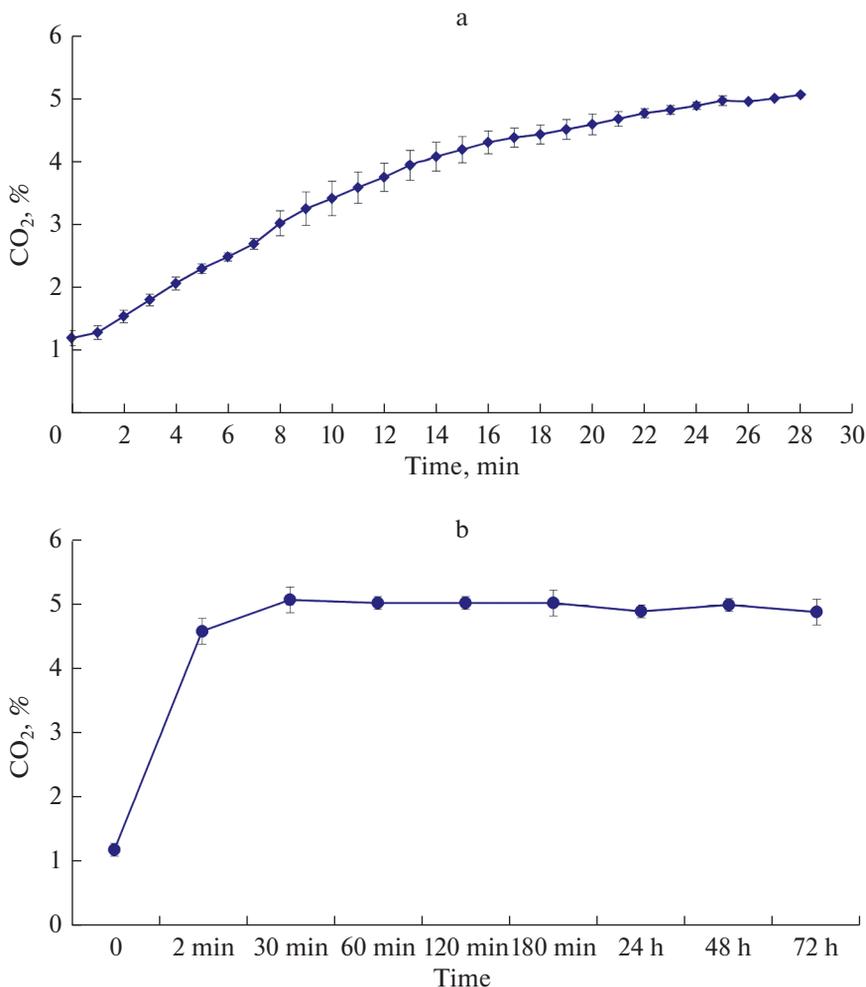


Рис. 2. Динамика содержания CO₂ в инкубаторе. (а) – после снижения содержания CO₂ при открывании дверцы инкубатора. (б) – в течение трех суток без открывания дверцы инкубатора.

подключенном регуляторе CO₂ наблюдали изменение окрашивания раствора с пурпурного до бледно-розового (рис. 3б). Анализ pH показал, что пурпурный цвет соответствовал значению 8.7, тогда как бледно-розовый – 7.0.

Далее эксперимент был повторен с первичной культурой мотонейронов. Инкубирование клеток в термостате в течение 12 ч при подключенном регуляторе CO₂ способствовало сохранению плотности и уровня жизнеспособности культуры (рис. 4а), тогда как отключение регулятора CO₂ приводило к гибели клеток и отрыванию их от субстрата (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы предложили простую систему для автоматизации контроля концентрации CO₂, которую можно использовать для изготовления просто-

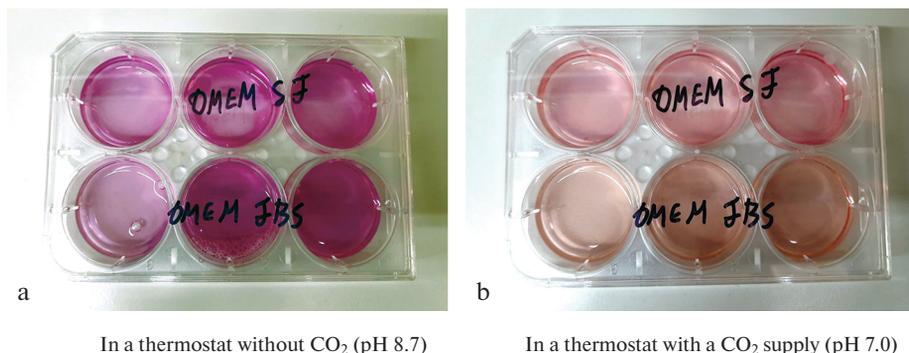


Рис. 3. Изменение цвета питательной среды, содержащей индикатор уровня pH, через 12 ч инкубации в термостате с выключенным (а) и включенным (б) регулятором CO₂.

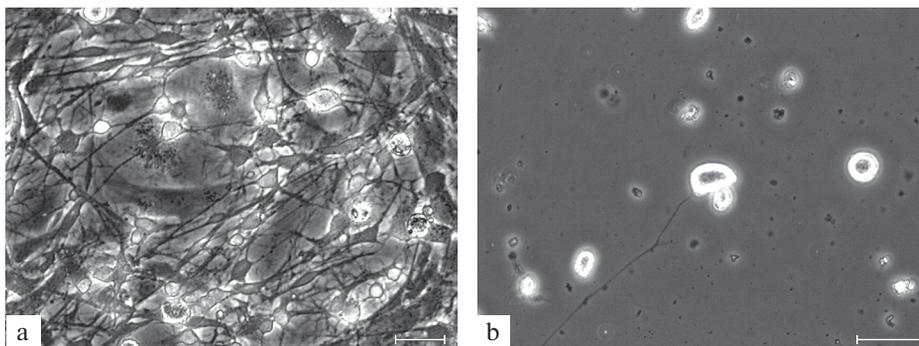


Рис. 4. Первичная культура мотонейронов крысы через 12 ч инкубации в термостате с включенным (а) и выключенным (б) регулятором CO₂. Размер шкалы – 20 мкм.

го и недорогого CO₂-инкубатора для выращивания клеточных культур. Регулятор концентрации CO₂ реализован на доступной платформе Arduino, легко настраивается и может использоваться в лабораторной практике в учебных заведениях и исследовательских лабораториях. В отличие от уже описанных устройств, наш инкубатор отличается более простой и гибкой конструкцией за счет того, что мы предлагаем усовершенствование уже имеющегося в лаборатории оборудования [7–9]. Стоит отметить, что для стабильной работы инкубатора клеток необходимо обеспечить равномерный нагрев и распределение газа по всему объему камеры. Это обеспечивается наличием вентилятора, им обычно оборудуются стандартные термостаты. При этом необходимо следить за герметичностью камеры инкубатора. Обычно термостаты имеют стеклянную дверь с уплотнителем. Наличие утечек газовой смеси будет компенсироваться автоматически, но повлияет на расход CO₂. Если необходимо поддерживать определенную влажность в камере инкубатора, можно использовать естественное испарение. Для этого расположить на нижней полке камеры открытую емкость с водой и, изменяя площадь испарения, регулировать влажность. Мы протестировали собранный CO₂-инкубатор и продемонстрировали эффективность его работы на примере выращивания первичной куль-

туры мотонейронов. При помощи разработанного регулятора возможно поддерживать необходимую концентрацию CO₂ в инкубаторе в автоматическом режиме в течение длительного времени. Система позволяет регулировать подачу газа за счет перепрограммирования контроллера и адаптировать ее для различных экспериментальных задач. Например, процесс восстановления концентрации CO₂ после открытия дверцы можно ускорить программным методом, увеличивая время открывания клапана. Было показано, что в инкубаторе с 5% CO₂ первичная культура мотонейронов нормально развивается, в то время как та же культура не продемонстрировала рост в обычном инкубаторе без регулятора содержания CO₂. Таким образом, предлагаемый нами подход позволяет изготовить недорогой CO₂-инкубатор для выращивания клеточных культур и существенно сэкономить бюджет исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00731, <https://rscf.ru/project/22-25-00731/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (Д.В.С.), проведение экспериментальной работы и обработка данных (М.А.С., Г.В.С.), написание и редактирование манускрипта (М.А.С., Г.В.С. и Д.В.С.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чепелева Е, Павлова С, Малахова А, Покушалов Е, Закиян С (2016) Получение культуры клеток из скелетной мускулатуры крысы для применения в клеточной терапии ишемических поражений сердца. Патол кровообращ и кардиохир 19: 28–32. [Chepeleva E, Pavlova S, Malahova A, Pokushalov E, Zakijan S (2016) Obtaining cell culture from rat skeletal muscles for use in cell therapy of ischemic heart lesions. Patol Kровоobrash Kardiohir 19: 28–32. (In Russ)]. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2015-4-2-28-32>
2. Sibgatullina GV, Malomouzh AI (2020) GABA in developing rat skeletal muscle and motor neurons. Protoplasma 257 (3): 1009–1015. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01485-1>
3. Das M, Rumsey JW, Bhargava N, Stancescu M, Hickman JJ (2010) A defined long-term in vitro tissue engineered model of neuromuscular junctions. Biomaterials 31: 4880–4888. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.02.055>
4. Мингалеева РН, Соловьева ВВ, Блафф НЛ, Ризванов АА (2013) Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов *in vitro*. Клеточн трансплантол и тканев инженерия VIII: 20–28. [Mingaleeva RN, Solov'eva VV, Blatt NL, Rizvanov AA (2013) The use of cell and tissue cultures for screening of antitumor drugs *in vitro*. Kletochn transplantol i tkanev inzhenerija VIII: 20–28. (In Russ)].
5. Fedorenko S, Stepanov A, Sibgatullina G, Samigullin D, Mukhitov A, Petrov K, Mendes R, Rümeli M, Giebeler L, Weise B, Gemming T, Nizameev I, Kholin K, Mustafina A (2019) Fluorescent magnetic nanoparticles for modulating the level of intracellular Ca²⁺ in motoneurons. Nanoscale 11: 16103–16113. <https://doi.org/10.1039/C9NR05071J>
6. McLimans WF (1972) The gaseous environment of the mammalian cell in culture. In: Growth, Nutrition, and Metabolism of Cells in Culture. Elsevier 137–170.
7. DIY CO₂ Incubator Bioreactor for Mammalian Cell Culture. <https://www.pellinglab.net/post/diy-incubator> Accessed 13 Sep 2022
8. Tayebi-Khorami M, Chegeni N, Birgani MT, Danyaei A, Fardid R, Zafari J (2022) Construction a CO₂ Incubator for Cell Culture with Capability of Transmitting Microwave Radiation. J Med

- Signals and Sensors 12: 127–132.
https://doi.org/10.4103/jmss.jmss_113_21
9. Arumugam A, Markham C, Aykar SS, Van Der Pol B, Dixon P, Wu M, Wong S (2021) PrintrLab incubator: A portable and low-cost CO₂ incubator based on an open-source 3D printer architecture. *PLoS One* 16: e0251812.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251812>
 10. Sibgatullina GV, Malomouzh AI (2020) GABA in developing rat skeletal muscle and motor neurons. *Protoplasma* 257: 1009–1015.
<https://doi.org/10.1007/s00709-020-01485-1>
 11. Pörtner R (2009) Characteristics of Mammalian Cells and Requirements for Cultivation BT-Cell and Tissue Reaction Engineering: With a Contribution by Martin Fussenegger and Wilfried Weber. In: Eibl R, Eibl D, Pörtner R, Catapano G, Czermak P (eds). Springer Berlin Heidelberg. 13–53.
 12. Eisenblätter T, Psathaki K, Nitz T, Galla H-J, Wegener J (2002) Cell culture media: selection and standardization. In: Claus-Michael Lehr (ed) Cell Culture Models of Biological Barriers. CRC Press. London. 46–66.
 13. Фрешни РЯ (2017) Культура животных клеток. 5th ed. БИНОМ. Лаборатория знаний. М. [*Freshni RJa* (2017) Animal Cell Culture. 5th ed. BINOM. Laboratory of Knowledge. M. (In Russ)].

Simple CO₂ Regulator for Laboratory Cell Incubator from Available Components

M. A. Suslov^a, G. V. Sibgatullina^a, and D. V. Samigullin^{a, b, *}

^a*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia*

^b*Kazan National Research Technical University named after A.N. Tupolev – KAI, Kazan, Russia*

**e-mail: samid75@mail.ru*

In this paper, we describe a CO₂ automation system for a laboratory cell incubator that will allow the production of a controlled CO₂ incubator from available laboratory equipment. The CO₂ controller is laboratory-built from simple components using the Arduino hardware/software platform and can be integrated into a laboratory thermostat. The article describes the results of test experiments on cell cultures, which demonstrate the performance of the design. Since CO₂ incubators are important and widespread scientific equipment, the information about our development presented in the article will be useful for a wide range of researchers.

Keywords: CO₂-incubator, CO₂ concentration controller, cell culture