

## СОДЕРЖАНИЕ

---

### Обзорные и проблемные статьи

Перспективы генной терапии эпилепсии с использованием векторов на основе кальций-зависимых калиевых каналов <i>Е. С. Никитин, П. М. Балабан, А. В. Зайцев</i>	795
Вторичная дисфункция энтерогематического барьера в патогенезе осложнений острых экзогенных отравлений <i>Ю. Ю. Ивницкий, Т. В. Шефер, В. Л. Рейнюк, О. А. Вакуненко</i>	807

---

### Экспериментальные статьи

Орексин-иммунопозитивные структуры ретикулярного ядра таламуса <i>И. Ю. Морина, И. В. Романова</i>	836
Влияние острого и хронического введения дексаметазона на аудиогенные судороги и каталепсию крыс линий Крушинского–Молодкиной и "0" <i>Н. М. Сурина, И. Б. Федотова, И. И. Полетаева</i>	850
Анализ нейрогенеза в гиппокампе мышей при краткосрочном антиортостатическом вывешивании <i>Е. А. Олейник, А. А. Наумова, Ю. С. Григорьева, В. Т. Бахтеева, Е. А. Лаврова, Е. В. Черниговская, М. В. Глазова</i>	861
Применение наивного байесовского классификатора для оценки влияния антипсихотических средств на параметры биоэлектрической активности головного мозга у крыс <i>Ю. И. Сысоев, Д. Д. Шиц, М. М. Пучик, В. А. Приходько, Р. Д. Идиятуллин, А. А. Котельникова, С. В. Оковитый</i>	874
Возрастные изменения микроглии спинного мозга крыс <i>Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский</i>	890
ЛПС стимулирует аккумуляцию триацилглицеринов и формирование липидных телец в клетках нейрональной линии РС12: роль даун-регуляции карнитин-пальмитоилтрансферазы-1 и снижения окисления жирных кислот <i>С. Д. Николаева, Е. М. Фок, Р. Г. Парнова</i>	903
Влияние плазменной кислоты на пролиферацию эндотелиальных клеток головного мозга крыс <i>in vitro</i> <i>Е. Д. Хилажева, Е. В. Лычковская, В. А. Кутяков, А. В. Моргул, В. В. Салмин</i>	917

---

---

# CONTENTS

---

## Reviews

Prospects for Gene Therapy of Epilepsy Using Calcium-Dependent Potassium Channel Vectors <i>E. S. Nikitin, P. M. Balaban, and A. V. Zaitsev</i>	795
Secondary Gut Barrier Dysfunction in the Pathogenesis of Complications of Acute Poisonings <i>Ju. Ju. Ivnitsky, T. V. Schäfer, V. L. Rejniuk, and O. A. Vakunenkov</i>	807

---

## Experimental Articles

Orexin-Immunopositive Structures of the Reticular Nucleus of the Thalamus <i>I. Yu. Morina and I. V. Romanova</i>	836
The Effects of Acute and Chronic Infusions of Dexamethasone on Audiogenic Seizures and Catalepsy in Rats of Krushinsky–Molodkina and “0” Strains <i>N. M. Suruna, I. B. Fedotova, and I. I. Poletaeva</i>	850
Analysis of Neurogenesis in the Hippocampus of Mice Exposed to Short-Term Hindlimb Unloading <i>E. A. Oleynik, A. A. Naumova, Y. S. Grigorieva, V. T. Bakhteeva, E. A. Lavrova, E. V. Chernigovskaya, and M. V. Glazova</i>	861
Use of Naive Bayes Classifier to Assess the Effects of Antipsychotic Agents on Brain Electrical Activity Parameters in Rats <i>Yu. I. Sysoev, D. D. Shite, M. M. Puchik, V. A. Prikhodko, R. D. Idiyatullin, A. A. Kotelnikova, and S. V. Okovityi</i>	874
Age-Related Changes of the Rat Spinal Cord Microglia <i>E. A. Kolos and D. E. Korzhevskii</i>	890
LPS Stimulates Triacylglycerol Accumulation and Lipid Droplets Biogenesis in PC12 Cells: Role of Down-Regulation of Carnitine-Palmitoyltransferase 1 and Suppression of Fatty Acid Oxidation <i>S. D. Nikolaeva, E. M. Fock, and R. G. Parnova</i>	903
Effects of Plasma Acid on Proliferation of Rat Brain Endothelial Cells <i>in vitro</i> <i>E. D. Khilazheva, E. V. Lychkovskaya, V. A. Kutuyakov, A. V. Morgun, and V. V. Salmin</i>	917

---

---

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ЭПИЛЕПСИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

© 2022 г. Е. С. Никитин<sup>1</sup>, \*, П. М. Балабан<sup>1</sup>, А. В. Зайцев<sup>2, 3</sup>

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

<sup>2</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: [nikitin@ihna.ru](mailto:nikitin@ihna.ru)

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.

После доработки 20.06.2022 г.

Принята к публикации 23.06.2022 г.

Эпилепсия является одним из распространенных неврологических заболеваний человека, при этом почти трети больных современные противосудорожные препараты не помогают полностью избавиться от эпилептических приступов. Поэтому поиск и разработка новых подходов лечения эпилепсии остается одной из актуальных проблем современной фундаментальной нейробиологии и клинической неврологии. В последние годы все большее внимание исследователей привлекает генная терапия эпилепсии. На сегодняшний день для генной терапии приоритетным направлением считается гиперэкспрессия каких-либо генов в нейронах, снижающих активность нейронных сетей в эпилептическом очаге, включая как экспрессию белков-каналов, так и тормозных нейромодуляторов. В данном обзоре мы рассматриваем возможность использования гиперэкспрессии кальций-зависимых калиевых каналов. Преимущество выбора данной подгруппы каналов для генной терапии может заключаться в том, что максимальная активация кальций-зависимых калиевых каналов и их гиперполяризующее действие реализуется при накоплении внутриклеточного кальция, что наблюдается при эпилептической активности в нейронных сетях. В клетках млекопитающих экспрессируется несколько подтипов кальций-зависимых калиевых каналов. Анализ имеющихся экспериментальных и клинических данных показывает, что каналы с промежуточной (IK-каналы) и малой проводимостью (SK-каналы) могут обладать высоким терапевтическим потенциалом для применения в генной терапии эпилепсии.

*Ключевые слова:* эпилепсия, генная терапия, SK-канал, IK-канал, BK-канал

DOI: 10.31857/S0869813922070068

По разным оценкам от 0.4 до 1% населения страдает от эпилепсии [1, 2]. Несмотря на успехи в создании новых противоэпилептических препаратов, полного избавления от судорожных припадков не удастся достичь почти у трети больных [2]. Наиболее эффективным методом лечения в таком случае является хирургическое удаление эпилептического очага [3], но и этот метод подходит не для всех пациентов из-за неприемлемых побочных последствий удаления мозговой ткани. Кроме того, есть существенный риск возникновения новых очагов после операционного вмешательства [4].

В последние годы все большее внимание исследователей привлекает генная терапия эпилепсии [5, 6]. Генная терапия традиционно определялась как способ замены дефектной копии гена его нормально работающей копией и восстановлением функции клеток [7]. Однако идиопатические формы эпилепсии, вызванные мутацией какого-то одного гена и вследствие этого нарушенной функцией канала или рецептора, встречаются относительно редко, а в большинстве случаев выявить конкретный генетический фактор не удается [8]. Кроме того, доставка генетического материала одновременно в обширные области мозга технически сложна, поэтому считается, что генная терапия имеет наибольшие перспективы для лечения фокальных форм эпилепсии [5].

Так как эпилептическая активность обусловлена нарушением баланса возбуждения и торможения в очаге, то усилия исследователей направлены в первую очередь на регуляцию возбудимости нейронов. Первоначально основные подходы были основаны на гиперэкспрессии ингибирующих пептидов, таких как галанин [9] или NPY [10], или подавлении возбудимости нейронов путем гиперэкспрессии в них калиевых каналов [11–13]. Однако эти воздействия должны быть хорошо рассчитаны и строго дозированы, так как скорректировать экспрессию в дальнейшем сложно. При недостаточной экспрессии противосудорожный эффект не достигается, а при избыточной – происходит нарушение функционирования нейронных сетей из-за избыточного торможения. Поэтому с практической точки зрения более интересны подходы, при которых эффективность торможения будет зависеть от степени возбуждения в нейронной сети, то есть будет задействован механизм обратной связи.

Одним из наиболее очевидных кандидатов для реализации такого подхода являются кальций-зависимые калиевые каналы [14]. Их активация обусловлена входом ионов кальция через ионотропные глутаматные рецепторы и потенциал-зависимые калиевые каналы при деполяризации нейронов, наблюдаемой при преобладании процессов возбуждения в нейронной сети. Работа кальций-зависимых калиевых каналов ведет в свою очередь к гиперполяризации нейронов и ослаблению их спайковой активности. Кальций-зависимые калиевые каналы весьма разнообразны по своим характеристикам [14]. В данном обзоре мы рассмотрим, какие типы каналов могут обладать наиболее высоким терапевтическим потенциалом при генной терапии и какие экспериментальные данные получены к настоящему времени.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

В геноме млекопитающих ~80 генов кодируют  $\alpha$ -субъединицы калиевых каналов, формирующие проводящую пору, и еще ~10 генов – вспомогательные регуляторные  $\beta$ -субъединицы [15]. Кроме того, посттранскрипционные модификации увеличивают разнообразие, поскольку варианты альтернативного сплайсинга одного гена могут сосуществовать в одном нейроне [16, 17].

Кальций-зависимые калиевые каналы являются одним из четырех основных семейств калиевых каналов, включающих в себя: (1) каналы утечки (tandem pore domain, TWIK/TRAAK/TREK/TASK), (2) каналы входящего выпрямляющего тока (Kir1–6, обычно активируются G-белками), (3) потенциал-активируемые каналы ( $K_v$ 1–12, основные быстрые каналы, реполяризующие нейрон после потенциала действия) и (4) кальций-зависимые каналы, подразделяемые на основе проводимости на 3 группы: BK (large conductance или big potassium,  $K_{Ca}$ 1.1) – каналы большой проводимости от 100 до 300 пСм; SK (small potassium,  $K_{Ca}$ 2.1–2.3) – каналы малой проводимости от 5 до 25 пСм; IK (intermediate potassium,  $K_{Ca}$ 3.1) – каналы промежуточной проводимости от 25 до 100 пСм. Особенностью кальций-зависи-

**Таблица 1.** Международные номенклатурные названия кальций-зависимых калиевых каналов человека и кодирующих их генов

IUPHAR	HGNC	Другие часто используемые аббревиатуры	Полные названия
K <sub>Ca</sub> 1.1	<i>KCNMA1</i>	Slo, Slo1, BK, Maxi-K	Big potassium; large conductance calcium-activated potassium channels
K <sub>Ca</sub> 2.1	<i>KCNN1</i>	SK <sub>Ca</sub> 1, SK1	Small potassium; small conductance calcium-activated potassium channels
K <sub>Ca</sub> 2.2	<i>KCNN2</i>	SK <sub>Ca</sub> 2, SK2	
K <sub>Ca</sub> 2.3	<i>KCNN3</i>	SK <sub>Ca</sub> 3, SK3	
K <sub>Ca</sub> 3.1	<i>KCNN4</i>	IK <sub>Ca</sub> 1, IK	Intermediate potassium; intermediate conductance calcium-activated potassium channels
K <sub>Ca</sub> 4.1	<i>KCNT1</i>	Slack, Slo2.2	Potassium channel subfamily T, member 1
K <sub>Ca</sub> 4.2	<i>KCNT2</i>	Slick, Slo2.1	Potassium channel subfamily T, member 2
K <sub>Ca</sub> 5.1	<i>KCNU1</i>	Slo3	Potassium channel, subfamily U, member 1

IUPHAR – International Union of Basic and Clinical Pharmacology (Международный союз фундаментальной и клинической фармакологии); HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee (Комитет по номенклатуре генов при Human Genome Organization (HUGO)).

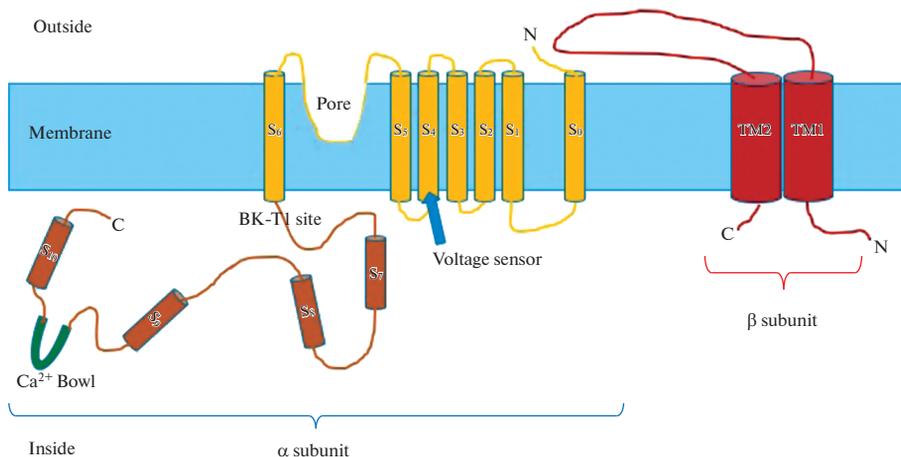
мых калиевых каналов является их активация или модуляция внутриклеточным кальцием. Современная номенклатура этих каналов приведена в табл. 1.

Кальций-зависимый канал представляет собой тетрамер из 4  $\alpha$ -субъединиц и 4  $\beta$ -субъединиц. Альфа-субъединица состоит из шести (SK) или семи (BK) трансмембранных единиц и большой внутриклеточной области. Именно эта субъединица образует пору, сенсор напряжения и кальций-чувствительную область (рис. 1). Сенсором напряжения служит трансмембранная область S4, содержащая несколько остатков аргинина, аналогично другим потенциал-зависимым калиевым каналам. Линкер между областями S5 и S6 служит для формирования поры канала, селективного для ионов калия. Внутри клетки основной частью является “кальциевая чаша”. Считается, что эта “чаша” является местом связывания кальция в BK-каналах [18].

Бета-субъединица канала является регуляторной субъединицей канала. Регуляторная  $\beta$ -субъединица состоит из двух предполагаемых трансмембранных (ТМ) единиц, соединенных внеклеточной петлей (рис. 1). Для BK-каналов известно четыре различных вида  $\beta$ -субъединиц [18]. Каналы, содержащие  $\beta$ 1- или  $\beta$ 4-субъединицы, редко инактивируются [19, 20], тогда как экспрессия  $\beta$ 2-субъединицы, наоборот, приводит к инаktivации BK-тока, что наблюдается в хромаффинных клетках и гиппокампальных нейронах [19]. К аналогичному тормозному эффекту приводит экспрессия  $\beta$ 3-субъединицы [21].

Кальций-зависимые каналы открываются при повышении уровня внутриклеточного кальция или модулируются им, что позволяет этим каналам отставлено реагировать на значительные изменения в уровне внутриклеточного кальция, к которым обычно приводит интенсивная электрическая активность нейронов. Однако BK-каналы также активируются при деполяризации мембраны и обеспечивают быструю следовую гиперполяризацию после потенциала действия. Считается, что эти различные режимы активации BK-каналов не зависят друг от друга.

Калиевые каналы SK [22] и IK [23] подтипов являются потенциал-независимыми и активируются внутриклеточным кальцием. Эти каналы отвечают за следовую гиперполяризацию после пачечной активности нейронов с достаточно медленной кинетикой (десятки и даже сотни миллисекунд). Ген IK-каналов (SK4/KCNN4) де-



**Рис. 1.** Молекулярная структура BK-канала. Схожую структуру имеют и другие подтипы этого семейства каналов (из [https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium-activated\\_potassium\\_channel](https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium-activated_potassium_channel)).

монстрирует гомологию ~40% с генами каналов SK типа 1–3 [24], что может повлечь за собой образование химерных гетеромерных каналов в нейронах, одновременно экспрессирующих KCa3.1 и один из подтипов SK-каналов [25].

В качестве сенсора внутриклеточного кальция эти каналы используют универсальный цитоплазматический кальциевый кофактор кальмодулин (CaM), аллостерический комплекс которого с кальцием вызывает открытие этих каналов [26]. Одним из наиболее ярких проявлений активации KCa3.1 каналов в нейроне является продолжительная (медленная) следовая гиперполяризация, отставленная от быстрой следовой гиперполяризации, которую вызывают потенциал-зависимые каналы, и сохраняющаяся сотни миллисекунд [23, 27]. Как следствие, KCa3.1-зависимая медленная следовая гиперполяризация улучшает способность нейрона к быстрой адаптации своего электрического спайкового разряда, увеличивая интервалы между последующими потенциалами действия [27].

В целом, открытие калиевых каналов после генерации разрядов снижает возбудимость нейрона и возвращает потенциал на мембране к значению потенциала покоя или даже ниже, вызывая следовую гиперполяризацию (состояние с пониженной вероятностью генерации электрических разрядов). Кроме того, калиевые каналы регулируют потенциал покоя, ограничивают частоту и длительность отдельных потенциалов действия, а также вносят вклад в рефрактерный период нейрона [26]. Важные функциональные особенности калиевых каналов определяют не только их вспомогательную роль в поддержании физиологических параметров электрической активности, но также их участие в жизненно-важных функциях нейрона, без которых невозможен устойчивый баланс возбуждения и торможения в ЦНС, который нарушается при развитии эпилепсии.

## КАНАЛОПАТИИ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ И ЭПИЛЕПСИЯ

Предполагается, что определенные каналопатии могут быть причиной развития судорожной активности в ЦНС и развития эпилепсии. Генетический скрининг пациентов с различными формами эпилепсии выявил многочисленные корреляции между проявлением заболевания и мутациями потери/усиления функции или нарушения проводимости различных калиевых каналов [28]. По крайней мере не-

сколькими независимыми исследователями в каждом случае, у пациентов были подтверждены epileптогенные мутации (нелетальные, но сопровождающиеся epileптическим фенотипом) представителей группы кальций-зависимых каналов (BK и KCa4.1), группы выпрямляющих каналов (Kir4 и Kir6), и множество потенциал-активируемых каналов (Kv1, Kv2, Kv3, Kv4, Kv7.2/3, Kv8.2, Kv10, Kv11.1). Из всех патологий каналов значительно выделяется нейроспецифический канал Kv7.2/3, мутации которого встречались примерно в половине случаев. Обычно мутации Kv7.2/3 вызывают формы эпилепсии, проявляющиеся в раннем детстве и варьирующие по степени тяжести от легкого неонатального синдрома, до тяжелых форм фармакорезистентной эпилепсии и ранней энцефалопатии, сопровождающейся интеллектуальной инвалидностью [29]. Для гена Kv7.3 (KCNQ3) были также определены позиции мутаций, наиболее сильно влияющие на прогноз тяжести заболевания [28]. В одном из вариантов семейной аутосомно-доминантной ночной лобной эпилепсии (ADNFLE) была выявлена мутация в гене *KCNT1* (KCa4.1) [30].

*KCNMA1*-каналопатии (BK-каналы) часто сопровождаются наличием двигательных дисфункций и развитием эпилепсии (у 35 из 69 человек с *KCNMA1*-каналопатией диагностирована эпилепсия) [31], однако к настоящему времени не выявлено связи между увеличением (gain of function) или ослаблением (loss of function) функциональной активности BK-каналов и клиническими проявлениями эпилепсии. Любые нарушения функциональной активности BK-каналов могут сопровождаться судорогами [31, 32].

В нейронах нижних бугров четверохолмия крыс с генетической предрасположенностью к эпилепсии (линия GEPR) показан сниженный уровень экспрессии белков SK1- и SK3-каналов, в то время как экспрессия SK2-каналов повышена [33]. Интересно, что активация SK-каналов с помощью 1-этил-2-бензимидазолина (1-EBIO) позволяла эффективно подавлять аудиогенные судороги, характерные для этой линии крыс [34].

## НАРУШЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

Не только каналопатии могут быть причиной развития эпилепсии, но и epileптическая активность может повлиять на экспрессию и активность различных каналов. Это становится очевидным при изучении моделей эпилепсии на животных, когда изменения функций каналов наблюдаются после повреждающего воздействия на мозг. Например, экспрессия Kv4.2-канала временно повышается в областях CA1 и CA3 гиппокампа крыс в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии, тогда как в хронической фазе экспрессия снижается [35].

В гиппокампе хронических крыс-эпилептиков часто наблюдается снижение функций кальций-зависимых BK-каналов [36], однако может наблюдаться и обратная картина. В модели эпилепсии, вызванной применением пикротоксина, токи через BK-каналы усиливаются у ювенильных крыс [37]. Неоднозначное действие BK-каналов на судорожную активность показало и применение фармакологических агентов. Так, некоторый эффект на ослабление судорог вызывали как активаторы, так и блокаторы BK-каналов [38].

Долговременное снижение экспрессии SK3-каналов как на уровне белка, так и на уровне мРНК, было показано в гиппокампе крыс после epileптического статуса, вызванного пилокарпином [39]. Также, недавние исследования [40] показали, что в пилокарпиновой модели височной эпилепсии в гиппокампе крыс происходит значительное долговременное снижение экспрессии KCa3.1-каналов, что сопровождается снижением медленной кальций-зависимой следовой гиперполяризации. Снижение уровня экспрессии KCa3.1-каналов (IK-каналов) опосредовано сигнальным путем, связанным с цАМФ-зависимой протеинкиназой A (PKA). Ин-

тересно, что применение ингибиторов РКА приводит к восстановлению функции КСа3.1-каналов и нормализации возбудимости нейронов [40]. Эти данные свидетельствуют о вовлеченности кальций-зависимых калиевых каналов в развитие эпилепсии, в то время как их аллели могут определять предрасположенность к этому заболеванию.

## ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ЭПИЛЕПСИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ

Традиционно, генно-терапевтические подходы разделяют на четыре основные категории: (1) замена гена при моногенных заболеваниях, (2) добавление гена при сложных патологиях, (3) изменение экспрессии генов и таргетинг РНК и (4) редактирование генома для внесения изменений [7]. При эпилепсии поражаются соматические нервные клетки, подвергнувшиеся полной дифференцировке и объединенные в сложные сети, организация и все функции которых остаются не до конца изученными. Поэтому на сегодняшний день для генной терапии эпилепсии используют подход № 2 (gain of function), добавляя новый ген для снижения активности нейрона-мишени. В качестве мишени обычно выбираются глутаматергические пирамидные нейроны кортикальных структур (неокортекса и гиппокампа).

Первые попытки генной терапии, возникшие на волне прорывных методов оптогенетики [11, 12], не увенчались значительными успехами, а исследователи, в свою очередь, ставили себе целью больше демонстрацию возможности управляемого снижения активности нейронной сети, а не разработку реального терапевтического метода. Кроме того, сложные оптогенетические методы требуют имплантации вглубь головного мозга передающих световодов, соединенных с внешним источником для фотоактивации светочувствительных каналов, а также удаления части ткани на пути световода, поэтому методы оптогенетической стимуляции вряд ли когда-либо будут применяться в клинике в таком виде. Поэтому в современных разработках предпочтение отдается каналам, активация которых происходит без необходимости использования внешних сигналов, а в ответ на какие-то внутренние изменения в нервных клетках по системе петли обратной связи.

В экспериментальных моделях генной терапии эпилепсии используют экспрессию дополнительных калиевых каналов или другие опосредованные способы модификации калиевой проводимости, которая представляется наиболее перспективным средством достижения терапевтических целей из-за важнейшей способности калиевых каналов к глубокой гиперполяризации нейрона. На первый взгляд, как альтернативу калиевым каналам можно было бы использовать анионные (хлорные) ионные каналы, также гиперполяризующие нейрон при их активации. Наиболее известный пример внутрисетевого торможения в ЦНС – это торможение с помощью ГАМК, медиатора интернейронов, активирующего ГАМК-чувствительные хлорные каналы у пирамидных нейронов. Однако хлорный потенциал реверсии сильно варьирует от нейрона к нейрону, а также различен в нейрональных компартментах одного нейрона.

По литературным данным, в гиперполяризованных нейронах открытие хлорных ГАМК-чувствительных каналов может вызвать серии потенциалов действия [41], в то время как оптогенетическая активация светочувствительных хлорных каналов может вызывать как подавление, так и усиление электрической спайковой активности [42, 43]. В недавней работе [44] было продемонстрировано, что проиктогенный эффект активации ГАМКергических интернейронов в определенных условиях усиливает судороги, однако при дополнительной оверэкспрессии калий-хлорного транспортера KCC2 в постсинаптических пирамидных нейронах активация ГАМКергических интернейронов уже подавляет судорожную актив-

ность. Известно, что значение потенциала реверсии хлорного тока расположено близко от потенциала покоя нейрона, поэтому даже небольшие сдвиги концентраций хлора во внутриклеточном и внеклеточном пространстве, происходящие при судорогах, способны его инвертировать, и тогда открытие хлорных каналов начинает уже возбуждать нейрон вместо торможения. Ситуацию изменяет усиление функции калий-хлорных транспортеров, которые быстро возвращают ионы хлора к исходным концентрациям, используя как движущую силу более стабильный и негативный градиент ионов калия.

Поэтому гиперполяризация нейронов в эпилептическом очаге с помощью дополнительной калиевой проводимости с теоретической точки зрения представляется на сегодняшний день наиболее эффективным подходом. Увеличить калиевую проводимость можно, используя калиевые каналы, которые будут быстро активироваться при гипервозбуждении в нейронной сети, обладать достаточно высокой проводимостью и относительно медленной инактивацией, чтобы успешно подавлять эпилептическую активность. Таким набором свойств потенциально обладают некоторые подтипы потенциал-активируемых калиевых каналов и кальций-зависимых калиевых каналов. Среди кальций-зависимых калиевых каналов оптимальным сочетанием свойств, вероятно, обладают IK и в меньшей степени, из-за малой проводимости, SK-каналы.

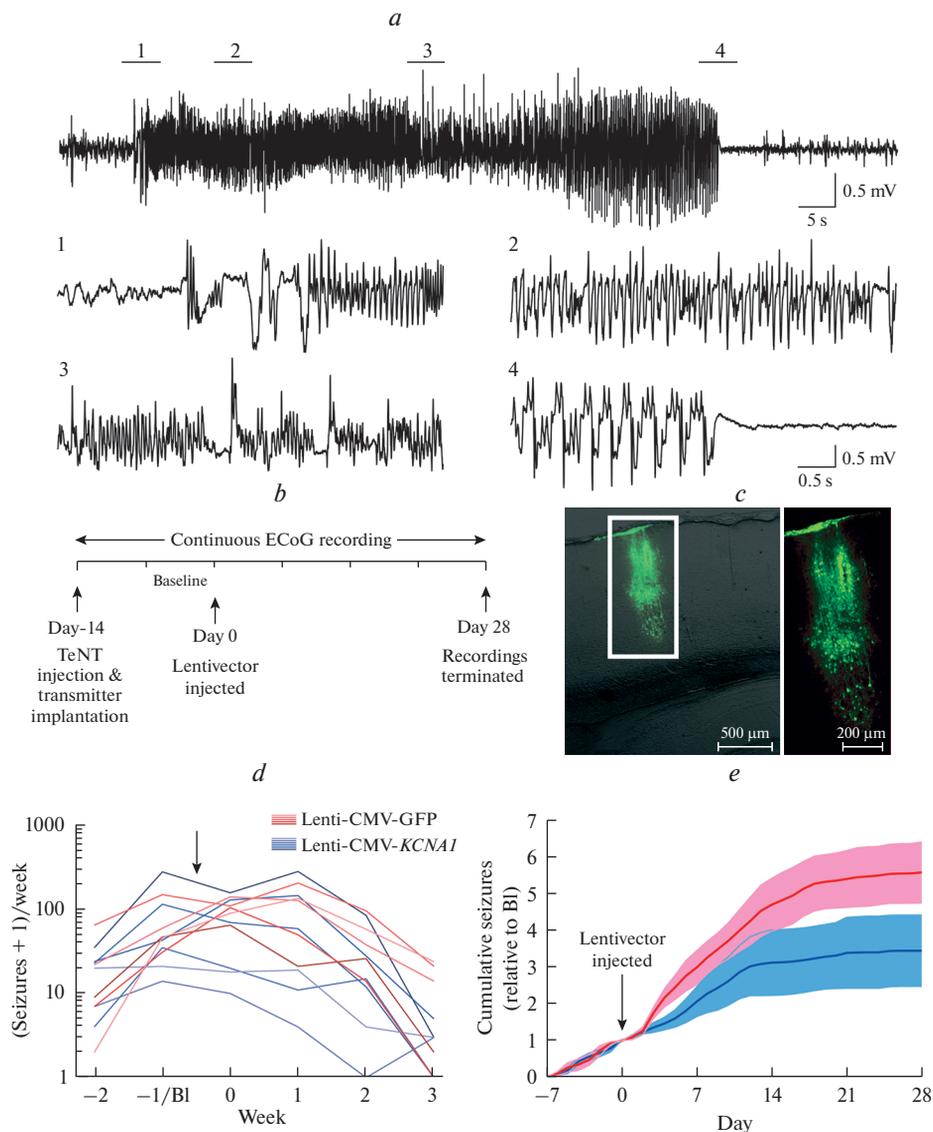
К настоящему времени нет опубликованных работ по генной терапии эпилепсии с использованием какого-либо подтипа кальций-зависимых калиевых каналов. Среди моделей генной терапии эпилепсии с использованием калиевой проводимости наиболее глубоко была разработана модель вектора на основе потенциал-активируемых калиевых каналов Kv1.1 (рис. 2). Группа исследователей из UCL (Университетский колледж Лондона) впоследствии дополнительно модифицировала этот канал генно-инженерными методами для уменьшения его инактивации и увеличения длительности открытого состояния с целью улучшения противосудорожного эффекта [13]. При возникновении судорог канал активировался многочисленными потенциалами действия в эпилептическом очаге и обеспечивал дополнительное обратное торможение сверхактивных нейронов.

Лентивирусный вектор с модифицированным каналом Kv1.1 протестировали на модели фокальной эпилепсии, вызванной инъекцией в мозг животных столбнячного токсина, необратимо повреждающего нейроны и вызывающего локальную патологическую активность. Инъекция вектора с Kv1.1 в эпилептический очаг вызывала достоверное снижение интенсивности эпилептических разрядов и стабильную компенсацию судорожной активности [13]. По результатам работы исследователи из UCL даже запатентовали последовательность генетически-модифицированного канала Kv1.1 как средство от эпилепсии, рассчитывая на скорое внедрение в клинику этого способа лечения.

Также стоит отметить другое важное исследование по генной терапии с использованием вирусного вектора для оверэкспрессии пре-динорфина [45]. Когда нейроны подвергаются судорожной активации, большее количество созревшего динорфина выбрасывается наружу в межнейронное соединение и активирует опиоидные рецепторы, которые, в свою очередь, открывают тормозные калиевые Kir-каналы. Это обеспечивает механизм обратной связи и позволяет нейронам самим реагировать на свою гиперактивность, выбрасывая дополнительный динорфин в случае необходимости.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фокальная эпилепсия часто бывает резистентной к лекарствам, а хирургическая операция по удалению эпилептогенного очага не всегда выполнима или эффективна.



**Рис. 2.** Генная терапия эпилепсии модифицированными каналами Kv1.1 (ген *KCNAl*) в модели заболевания, вызванного токсином столбняка, введенным в кору больших полушарий грызуна. (а) – Репрезентативные записи судорог в теменной коре через две недели после инъекции столбнячного токсина (TeNT) в первичную зрительную кору (также приведены увеличенные участки 1–4). (б) – Схема эксперимента с последовательностью экспериментальных воздействий и измерений. (с) – Внедрение в нейроны вектора Lenti-CMV-KCNA1 ограничивалось небольшой областью ~500–1000 мкм вблизи места инъекции. (д) – Число судорог у животных, получивших инъекцию Kv1 (*KCNAl*), достоверно снижается по сравнению с контрольными животными (GFP), что говорит об ослаблении модельной эпилепсии при терапии калиевыми каналами. (е) – Суммарная гистограмма показывает достоверное снижение судорожной активности у животных, получивших инъекцию Kv1 (*KCNAl*) (синяя кривая) по сравнению с контрольными животными (красная кривая). С незначительными модификациями из [13].

на. Поэтому разработка пространственно-ограниченной, специфической генной терапии, которая избирательно изменяет активность нейронов в очаге припадка, может стать важным шагом в лечении эпилепсии. В случае успеха эта стратегия также поможет свести к минимуму побочные эффекты, наблюдаемые при использовании фармакологических подходов.

Поскольку калиевые каналы чрезвычайно важны для внутреннего ограничения собственной активности и возбудимости нейрона, то воздействие на калиевую проводимость методом генной терапии имеет громадный потенциал для лечения эпилептических расстройств. С теоретической точки зрения гиперэкспрессия кальций-зависимых калиевых каналов IK подтипа, обладающих достаточно высокой проводимостью и медленной кинетикой инактивации, представляется одним из наиболее перспективных вариантов для подавления гипервозбудимости нейронов в эпилептическом очаге. Однако такой вариант генной терапии еще не реализован и необходима его экспериментальная проверка. Тем не менее, наличие достаточно большого спектра методов генной терапии, уже доказавших свою эффективность в доклинических исследованиях, позволяет предположить, что клиническое испытание некоторых из этих методов для терапии эпилепсии начнется уже в ближайшие годы.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Министерство науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2020-801.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея статьи (Е.С.Н. и А.В.З.), подготовка черновика статьи (Е.С.Н. и А.В.З.), редактирование и подготовка финальной версии обзора (Е.С.Н., П.М.Б., А.В.З.).

#### Список литературы

1. *Banerjee PN, Filippi D, Hauser AW* (2009) The descriptive epidemiology of epilepsy—A review. *Epilepsy Res* 85: 31–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2009.03.003>
2. *Janmohamed M, Brodie MJ, Kwan P* (2020) Pharmacoresistance – Epidemiology, mechanisms, and impact on epilepsy treatment. *Neuropharmacology* 168: 107790.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107790>
3. *Engel J* (2018) The current place of epilepsy surgery. *Curr Opin Neurol* 31: 192–197.  
<https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000528>
4. *Schramm J* (2008) Temporal lobe epilepsy surgery and the quest for optimal extent of resection: a review. *Epilepsia* 49: 1296–307.  
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01604.x>
5. *Walker MC, Kullmann DM* (2020) Optogenetic and chemogenetic therapies for epilepsy. *Neuropharmacology* 168: 107751.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107751>
6. *Simonato M* (2014) Gene therapy for epilepsy. *Epilepsy Behav* 38: 125–130.  
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.09.013>
7. *Wang D, Gao G* (2014) State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications. *Discov Med* 18: 151–161.
8. *Thomas RH, Berkovic SF* (2014) The hidden genetics of epilepsy—a clinically important new paradigm. *Nat Rev Neurol* 10: 283–292.  
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.62>
9. *McCown TJ* (2006) Adeno-associated Virus-Mediated Expression and Constitutive Secretion of Galanin Suppresses Limbic Seizure Activity in Vivo. *Mol Ther* 14: 63–68.  
<https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2006.04.004>

10. Noè F, Pool AH, Nissinen J, Gobbi M, Bland R, Rizzi M, Balducci C, Ferraguti F, Sperk G, During MJ, Pitkänen A, Vezzani A (2008) Neuropeptide Y gene therapy decreases chronic spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Brain* 131: 1506–1515.  
<https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWN079>
11. Bernard C (2012) Treating Epilepsy with a Light Potassium Diet. *Sci Transl Med* 4.  
<https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3005297>
12. Wykes RC, Heeroma JH, Mantoan L, Zheng K, MacDonald DC, Deisseroth K, Hashemi KS, Walker MC, Schorge S, Kullmann DM (2012) Optogenetic and potassium channel gene therapy in a rodent model of focal neocortical epilepsy. *Sci Transl Med* 4: 161ra152.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004190>
13. Snowball A, Chabrol E, Wykes RC, Shekh-Ahmad T, Cornford JH, Lieb A, Hughes MP, Massaro G, Rahim AA, Hashemi KS, Kullmann DM, Walker MC, Schorge S (2019) Epilepsy Gene Therapy Using an Engineered Potassium Channel. *J Neurosci* 39: 3159–3169.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1143-18.2019>
14. Nikitin ES, Balaban PM (2021) Diversity and Functional Features of Calcium-Dependent Potassium Channels as Determinants of Their Role in the Plasticity of Cerebral Neurons. *Neurosci Behav Physiol* 519 (51): 1239–1243.  
<https://doi.org/10.1007/S11055-021-01186-Z>
15. Trimmer JS (2015) Subcellular Localization of K<sup>+</sup> Channels in Mammalian Brain Neurons: Remarkable Precision in the Midst of Extraordinary Complexity. *Neuron* 85: 238–256.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.042>
16. Bell TJ, Miyashiro KY, Sul J-Y, Buckley PT, Lee MT, McCullough R, Jochems J, Kim J, Cantor CR, Parsons TD, Eberwine JH (2010) Intron retention facilitates splice variant diversity in calcium-activated big potassium channel populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21152–21157.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1015264107>
17. Tian Y, Liao IH, Zhan X, Gunther JR, Ander BP, Liu D, Lit L, Jickling GC, Corbett BA, Bos-Veneman NGP, Hoeksira PJ, Sharp FR (2011) Exon expression and alternatively spliced genes in tourette syndrome. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 156: 72–78.  
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31140>
18. Ghatta S, Nimmaqadda D, Xu X, O'Rourke ST (2006) Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110: 103–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.10.007>
19. Wallner M, Meera P, Toro L (1999) Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: A transmembrane  $\beta$ -subunit homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4137–4142.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4137>
20. Meera P, Wallner M, Toro L (2000) A neuronal  $\beta$  subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5562–5567.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.100118597>
21. Xia X-M, Ding JP, Lingle CJ (1999) Molecular Basis for the Inactivation of Ca<sup>2+</sup>- and Voltage-Dependent BK Channels in Adrenal Chromaffin Cells and Rat Insulinoma Tumor Cells. *J Neurosci* 19: 5255–5264.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-13-05255.1999>
22. Köhler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion N V, Maylie J, Adelman JP (1996) Small-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels from Mammalian Brain. *Science* (80) 273: 1709–1714.  
<https://doi.org/10.1126/science.273.5282.1709>
23. King B, Rizwan AP, Asmara H, Heath NC, Engbers JDT, Dykstra S, Bartoletti TM, Hameed S, Zamponi GW, Turner RW (2015) IKCa Channels Are a Critical Determinant of the Slow AHP in CA1 Pyramidal Neurons. *Cell Rep* 11: 175–182.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.026>
24. Joiner WJ, Wang L-Y, Tang MD, Kaczmarek LK (1997) hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11013–11018.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.11013>
25. Higham J, Sahu G, Wazen R-M, Colarusso P, Gregorie A, Harvey BSJ, Goudswaard L, Varley G, Sheppard DN, Turner RW, Marrion N V (2019) Preferred Formation of Heteromeric Channels between Coexpressed SK1 and IKCa Channel Subunits Provides a Unique Pharmacological Profile of Ca<sup>2+</sup>-Activated Potassium Channels. *Mol Pharmacol* 96: 115–126.  
<https://doi.org/10.1124/mol.118.115634>
26. Bean BP (2007) The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8: 451–465.  
<https://doi.org/10.1038/nrn2148>
27. Roshchin MV, Ierusalimsky VN, Balaban PM, Nikitin ES (2020) Ca<sup>2+</sup>-activated KCa3.1 potassium channels contribute to the slow afterhyperpolarization in L5 neocortical pyramidal neurons. *Sci Rep* 10: 14484.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71415-x>

28. Nikitin E, Vinogradova L (2021) Potassium channels as prominent targets and tools for the treatment of epilepsy. *Expert Opin Ther Targets* 25: 223–235.  
<https://doi.org/10.1080/14728222.2021.1908263>
29. Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, Barrese V, Migliore M, Cilio MR, Taghialatela M (2013) Genotype–phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K v 7.2 potassium channel subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4386–4391.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1216867110>
30. Heron SE, Smith KR, Bahlo M, Nobili L, Kahana E, Licchetta L, Oliver KL, Mazarib A, Afawi Z, Korczyn A, Plazzi G, Petrou S, Berkovic SF, Scheffer IE, Dibbens LM (2012) Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 44: 1188–1190.  
<https://doi.org/10.1038/ng.2440>
31. Miller JP, Moldenhauer HJ, Keros S, Meredith AL (2021) An emerging spectrum of variants and clinical features in KCNNM1-linked channelopathy. *Channels* 15: 447–464.  
<https://doi.org/10.1080/19336950.2021.1938852>
32. N’Gouemo P (2014) BK Ca channel dysfunction in neurological diseases. *Front Physiol* 5: 373.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00373>
33. N’Gouemo P, Yasuda RP, Faingold CL (2009) Protein expression of small conductance calcium-activated potassium channels is altered in inferior colliculus neurons of the genetically epilepsy-prone rat. *Brain Res* 1270: 107–111.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.034>
34. Khandai P, Forcelli PA, N’Gouemo P (2020) Activation of small conductance calcium-activated potassium channels suppresses seizure susceptibility in the genetically epilepsy-prone rats. *Neuropharmacology* 163: 107865.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107865>
35. Su T, Cong WD, Long YS, Luo AH, Sun WW, Deng WY, Liao WP (2008) Altered expression of voltage-gated potassium channel 4.2 and voltage-gated potassium channel 4-interacting protein, and changes in intracellular calcium levels following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience* 157: 566–576.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.09.027>
36. Pacheco Ojalora LF, Hernandez EF, Arshadmansab MF, Francisco S, Willis M, Ermolinsky B, Zarei M, Knaus H-G, Garrido-Sanabria ER (2008) Down-regulation of BK channel expression in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1200: 116–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.017>
37. Shrutii S, Clem RL, Barth AL (2008) A seizure-induced gain-of-function in BK channels is associated with elevated firing activity in neocortical pyramidal neurons. *Neurobiol Dis* 30: 323–330.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.02.002>
38. Leo A, Citraro R, Constanti A, De Sarro G, Russo E (2015) Are big potassium-type Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels a viable target for the treatment of epilepsy? *Expert Opin Ther Targets* 19: 911–926.  
<https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1026258>
39. Oliveira MS, Skinner F, Arshadmansab MF, Garcia I, Mello CF, Knaus H-G, Ermolinsky BS, Ojalora LFP, Garrido-Sanabria ER (2010) Altered expression and function of small-conductance (SK) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in pilocarpine-treated epileptic rats. *Brain Res* 1348: 187–199.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.095>
40. Tiwari MN, Mohan S, Biala Y, Yaari Y (2019) Protein Kinase A-Mediated Suppression of the Slow Afterhyperpolarizing KCa<sub>3.1</sub> Current in Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci* 39: 9914–9926.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1603-19.2019>
41. Chavas J, Marty A (2003) Coexistence of Excitatory and Inhibitory GABA Synapses in the Cerebellar Interneuron Network. *J Neurosci* 23: 2019–2031.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-06-02019.2003>
42. Malyshev AY, Roshchin MV, Smirnova GR, Dolgikh DA, Balaban PM, Ostrovsky MA (2017) Chloride conducting light activated channel GtACR2 can produce both cessation of firing and generation of action potentials in cortical neurons in response to light. *Neurosci Lett* 640: 76–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.026>
43. Messier JE, Chen H, Cai Z-L, Xue M (2018) Targeting light-gated chloride channels to neuronal somatodendritic domain reduces their excitatory effect in the axon. *Elife* 7.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.38506>
44. Magloire V, Cornford J, Lieb A, Kullmann DM, Pavlov I (2019) KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-promoting action of somatic inhibition. *Nat Commun* 10: 1225.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08933-4>
45. Agostinho AS, Mietzsch M, Zangrandi L, Kmiec I, Mutti A, Kraus L, Fidzinski P, Schneider UC, Holtkamp M, Heilbronn R, Schwarzer C (2019) Dynorphin-based “release on demand” gene therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy. *EMBO Mol Med* 11: e9963.  
<https://doi.org/10.15252/emmm.201809963>

**Prospects for Gene Therapy of Epilepsy  
Using Calcium-Dependent Potassium Channel Vectors**

**E. S. Nikitin<sup>a, \*</sup>, P. M. Balaban<sup>a</sup>, and A. V. Zaitsev<sup>b, c</sup>**

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

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

<sup>c</sup>*Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia*

*\*e-mail: nikitin@ihna.ru*

Epilepsy is one of the widespread neurological diseases in humans, and nearly a third of patients are not completely relieved from epileptic seizures by anticonvulsants. Therefore, research and development of new treatment approaches for epilepsy remains one of the urgent challenges for modern basic neurobiology and clinical neurology. In recent years, gene therapy for epilepsy has attracted increasing attention of researchers. Today, the priority for gene therapy is considered to be the overexpression of some genes in neurons that reduce the activity of neuronal networks in the epileptic focus, including both the expression of channel proteins and inhibitory neuromodulators. In this review, we consider the possibility of using overexpression of calcium-dependent potassium channels. The advantage of targeting this subgroup of channels for gene therapy may lie in the fact that maximal activation of calcium-dependent potassium channels and their hyperpolarizing effects are realized during intracellular calcium accumulation, which is observed during epileptic activity in neuronal networks. Several subtypes of calcium-dependent potassium channels are expressed in mammalian cells. Analysis of the available experimental and clinical data shows that channels with intermediate (IK channels) and small conductance (SK channels) may have a high therapeutic potential for use in epilepsy gene therapy.

*Keywords:* epilepsy, gene therapy, SK channel, IK channel, BK channel

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**ВТОРИЧНАЯ ДИСФУНКЦИЯ ЭНТЕРОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА  
В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСЛОЖНЕНИЙ ОСТРЫХ ЭКЗОГЕННЫХ ОТРАВЛЕНИЙ**

© 2022 г. Ю. Ю. Ивницкий<sup>1</sup>, Т. В. Шефер<sup>2</sup>, \*, В. Л. Рейнюк<sup>1</sup>, О. А. Вакуненкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н. Голикова  
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины  
Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: schafar@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.04.2022 г.

После доработки 23.05.2022 г.

Принята к публикации 24.05.2022 г.

Последнее десятилетие ознаменовано экспоненциальным ростом числа публикаций, посвященных физиологической роли нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта человека. Представление о симбиотической связи человека с нормальной микробиотой его желудочно-кишечного тракта утвердилось как неотъемлемая часть медико-биологической парадигмы. Однако тип этого симбиоза варьирует от мутуализма до паразитизма и зависит от функционального состояния организма хозяина. Повреждение последнего внешними агентами может вести к возникновению у нормальной кишечной микробиоты условно патогенных свойств, опосредованных гуморальными факторами и влияющих на исход экзогенного воздействия. Неопределенное число веществ, продуцируемых нормальной кишечной микробиотой человека, обладает системной токсичностью. Некоторые из них кишечный химус содержит в количествах, которые, при быстром поступлении таких веществ в кровь, обеспечивают формирование в ней их потенциально летальных концентраций. Этому препятствует энтерогематический барьер – система структурных элементов, разделяющих кишечный химус и кровь. Его повреждение экзогенными токсикантами, обозначенное в настоящем обзоре как вторичная дисфункция энтерогематического барьера, может спровоцировать системное перераспределение токсичных веществ бактериального происхождения. До недавних пор влияние такого перераспределения на исход острых экзогенных отравлений оставалось вне фокуса внимания токсикологии. В настоящем обзоре исследованы причинно-следственные связи между вторичной дисфункцией энтерогематического барьера и осложнениями острых отравлений. Детализирована острая системная токсичность продуктов жизнедеятельности нормальной кишечной микрофлоры: аммиака и эндотоксина. Показана их вовлеченность в формирование ряда осложнений острых отравлений: шока, сепсиса, церебральной недостаточности и повреждений легких. Кратко изложены принципы оценки функционального состояния энтерогематического барьера и подходы к профилактике осложнений острых отравлений, основанные на роли энтерогематического барьера в их патогенезе.

*Ключевые слова:* аммиак, нормальная кишечная микробиота, осложнение, острое экзогенное отравление, эндотоксемия, эндотоксикоз, энтерогематический барьер

DOI: 10.31857/S0869813922070020

Юридический анализ причин смерти пациента предполагает выбор из четырех возможностей: несвоевременное, неправильное, недостаточное оказание медицинской помощи или отсутствие ее связи с исходом заболевания [1]. Один из источников ошибок при таком выборе – непредсказуемость осложнений острых заболеваний, ярко проявившаяся во время эпидемии COVID-19 [2]. Непредсказуемость при-суща и осложнениям острых отравлений: острые расстройства кровообращения, сепсис, вторичные острые повреждения легких и острая церебральная недостаточность осложняют их не у всех пациентов. Причины этой индивидуальной вариабельности требуют детализации.

Ранее мы показали, что при острых отравлениях вероятность летальных осложнений зависит от функционального состояния сосудистого эндотелия [3]. Некоторые повреждающие его вещества продуцирует нормальная микробиота кишечника [4]. Основываясь на концепции, согласно которой организм человека – экосистема, частью которой является кишечная микробиота [5, 6], эти вещества далее рассматриваются как эндогенные. У здоровых людей способность таких веществ преодолевать энтерогематический барьер – систему структурных элементов, разделяющих кишечный химус и кровь, – незначительна, а их латентная утечка ведет к ряду хронических заболеваний [4, 6]. При легких экзогенных отравлениях эффекты эндогенных веществ кишечного происхождения могут затмеваться прямым токсическим действием ксенобиотика. Однако их массивное поступление в кровь при тяжелых экзогенных отравлениях может отягощать состояние организма и вовлекаться в патогенез осложнений.

Прямое или косвенное повреждение ксенобиотиком энтерогематического барьера, далее именуемое его вторичной дисфункцией, может провоцировать поступление в кровотоки метаболитов и клеточных компонентов бактерий в дозах, влияющих на исход острого экзогенного отравления. *A priori* состав смеси этих веществ зависит от состава кишечной микробиоты, который индивидуально варьируется [5], а согласно некоторым оценкам [7], даже уникален. Эта вариабельность может лежать в основе стохастичности осложнений острых отравлений.

Накоплен большой массив данных, характеризующих влияние ксенобиотиков на энтерогематический барьер. Имеются и многочисленные данные о вовлеченности токсичных веществ кишечного происхождения в патогенез критических состояний организма. Это позволяет впервые проследить связь между вторичной дисфункцией энтерогематического барьера и некоторыми осложнениями острых отравлений. Такая связь явилась предметом настоящего обзора.

Целью обзора явилось выявление путей профилактики осложнений острых отравлений на основе идентификации роли вторичной дисфункции энтерогематического барьера в их патогенезе.

## ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И АББРЕВИАТУРЫ

*Бактериальные метаболиты малой молекулярной массы* – вещества с молекулярной массой менее 1500 Да, продуцируемые бактериями.

*Бактериальные экзотоксины* – токсичные протеины и пептиды, выделяемые живой бактерией во внешнюю среду.

*Вторичная дисфункция энтерогематического барьера* – нарушение функции энтерогематического барьера, вызванное внешним воздействием.

*Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ)* – система структурных элементов, разделяющих кровь и центральную нервную систему (ЦНС).

*Ксенобиотик* – чужеродное вещество.

*Первичная дисфункция энтерогематического барьера* – преформированное хроническое нарушение функции энтерогематического барьера.

*Токсикант* – любое вещество, при воздействии в данной дозе повреждающее организм немеханическим путем.

*Эндогенное вещество* – соединение, продуцируемое клетками хозяина или симбионтными микроорганизмами.

*Эндотоксемия* – накопление в крови токсичных эндогенных веществ, включая вещества малой молекулярной массы тканевого или бактериального происхождения, бактериальные экзотоксины и эндотоксин.

*Эндотоксикоз* – совокупность клинических проявлений эндотоксемии.

*Эндотоксин* – сумма липополисахаридов внешней стенки грамотрицательных бактерий.

*Эндотоксинемия* – накопление в крови эндотоксина.

*Энтерогематический барьер (ЭГБ)* – система структурных элементов, разделяющих кишечный химус и кровь.

## ПОРЯДОК ОТБОРА ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

Поиск данных, характеризующих связь осложнений острых отравлений со вторичной дисфункцией ЭГБ, показал очевидную новизну этой тематики. Поэтому настоящий обзор представляет лишь основную информацию по ней, формулирует концепцию и не является систематическим. В нем цитируются преимущественно публикации за предыдущие 10 лет, либо более ранние работы, имеющие фундаментальное значение. Основным источником информации служила база данных PubMed. Использовали запрос: “acute poisoning AND (gut microbiota OR intestinal microflora OR gut microflora OR metabolome OR human gut microbiome OR gut barrier OR leaky gut syndrome OR intestinal barrier OR gut–brain axis OR gut–liver axis)”. При анализе не использовали тезисы докладов на конференциях.

## СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НОРМАЛЬНОГО ЭГБ

ЭГБ состоит из муцина, эпителия слизистой оболочки кишки [8], ассоциированных с эпителием симбионтных микроорганизмов [9] и эндотелия подслизистых гемо- и лимфокапилляров [10]. Вещества, избегшие абсорбции гемо- и лимфокапиллярными сплетениями кишечной стенки, на своем пути в кровь преодолевают дополнительные структурные элементы ЭГБ: гладкомышечный слой, мезотелий висцерального и париетального листков брюшины, слой смачивающей их жидкости и эндотелий гемо- и лимфокапилляров париетальной брюшины.

Слой муцина толщиной 150 мкм, состоящий из гидратированных гликопротеинов, отделяет эпителиальные клетки от агрессивной среды люминального пространства кишечника. Формирование муцина нарушается при ишемии слизистой оболочки, что наиболее опасно для толстой кишки с ее высокой плотностью бактериальной колонизации. В норме симбионтные аэробные бактерии вытесняют патогенную микрофлору с апикальной поверхности энтеро- и колоноцитов, в то же самое время обеспечивая их эссенциальными веществами [5]. Основная функция монослоя эпителиальных клеток толщиной 20 мкм состоит в селективной абсорбции веществ из химуса.

Благодаря наличию ворсинок в тонкой и крипт в толстой кишке площадь абсорбирующей поверхности слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта достигает 200 м<sup>2</sup> [8]. В норме вещества абсорбируются из кишечного химуса преимущественно трансцеллюлярно. Доля парацеллюлярного транспорта предположительно пропорциональна доле межклеточных контактов на люминальной поверхности кишечника, оцениваемой в 0.1% [11]. Межклеточные контакты двух типов: плотные и адгезионные – состоят из актина и, соединяя плазматические мембраны со-

седних клеток с их цитоскелетом, обеспечивают прочность эпителия [8]. Межклеточные контакты служат объектом повреждающего действия ряда ксенобиотиков [12], на фоне которого доля парацеллюлярного транспорта возрастает.

Часть образовавшихся в химусе веществ, преодолевших кишечный эпителий, поступает в сеть гемо- и лимфокапилляров подслизистого слоя и далее в бассейны *v. portae* и *ducti thoracici*; в норме этот путь является основным. Другая часть, преодолев висцеральный и париетальный листки брюшины, а также разделяющий их слой жидкости толщиной в 0.25 мм, поступает в лимфатические сосуды бассейна *ducti thoracici* или в гемокapиллярную сеть бассейна *v. cavae inferioris*. Этот процесс, трансперитонеальная диффузия, облегчается отсутствием в толстой кишке диффузионного препятствия в виде сплошного продольного мышечного слоя [13]. Экспериментально показана трансперитонеальная диффузия аммиака [14] и эндотоксина [15]. Вещества, вовлеченные в трансперитонеальную диффузию, на своем пути в общий кровоток избегают пресистемного метаболизма в печени. При портальной гипертензии роль трансперитонеальной диффузии может возрасть в связи с замедлением доставки веществ кишечного происхождения в бассейн *v. portae* [16]. Трансперитонеальная диффузия служит мишенью детоксикационной терапии с использованием перитонеального диализа [17].

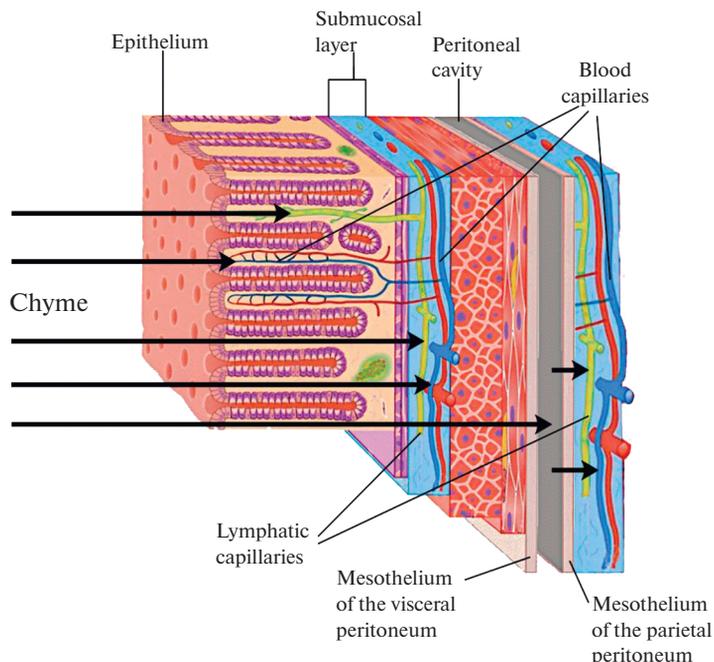
В норме ЭГБ непроницаем для бактерий, населяющих кишечник: ДНК *Escherichia coli*, *Bacteroides* обнаруживали в плазме крови только на фоне повреждения ЭГБ [18]. Вещества, подлежащие удалению из организма, проникают из химуса в кровь путем пассивной диффузии [19]. Их абсорбция аппроксимируется [20] уравнением первого закона диффузии Фика для мембран:  $J = D(C_i - C_o)$ , где  $J$  – плотность потока, моль  $m^{-2} c^{-1}$ ;  $D$  – коэффициент проницаемости мембраны, м  $c^{-1}$ ;  $C_i$  и  $C_o$  – концентрация вещества с эпителиальной и эндотелиальной сторон мембраны, моль  $m^{-3}$ . Биодоступность токсичных продуктов жизнедеятельности кишечной микробиоты возрастает со значениями множителей  $(C_i - C_o)$  и  $D$ . Первый лимитирован содержанием этих веществ в химусе, второй – состоянием ЭГБ. Предположительно, абсорбция возрастает с увеличением гидравлического давления химуса вследствие гладкомышечного спазма и (или) интенсификации газообразования [21]. Маршруты диффузии веществ из кишечного химуса в лимфу и кровь схематически показаны на рис. 1.

## НОРМАЛЬНАЯ МИКРОБИОТА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Прокариоты более четырехсот видов населяют желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) здорового человека. Общее число их клеток превышает число клеток организма хозяина, а масса оценивается в 0.3% массы тела [22]. Плотность бактериальной колонизации дистальных отделов ЖКТ больше, чем проксимальных (табл. 1).

Образцы содержимого желудка, взятые натощак, практически стерильны. При гипохлоргидрии бактерий в просвете желудка больше, и они представлены в основном облигатными анаэробами, стрептококками, лактобациллами, нейссериями и стафилококками. При  $pH > 5.0$  микробный состав содержимого желудка не отличим от микробного состава содержимого тонкой кишки. У  $\frac{1}{2}$  людей в возрасте 51–60 лет в слое муцина слизистой оболочки желудка выявляется грамотрицательная бактерия *Helicobacter pylori*, продуцирующая аммиак. У инфицированных ею повышается pH содержимого желудка, что неблагоприятно изменяет состав микрофлоры дистальных отделов ЖКТ [23].

В двенадцатиперстной и тощей кишках вегетация бактерий уравновешена их быстрым удалением в результате секреции, моторики и бактерицидного действия желчи; преобладают грамположительные кокки (*Streptococci*, *Peptococci*) и бациллы (*Lactobacilli*, *Bifidobacteria*). Микробиота терминального отдела подвздошной киш-



**Рис. 1.** Диффузия токсичных веществ из кишечного химуса в кровь и лимфу. Стрелками указаны ключевые промежуточные точки пути диффузии.

ки за счет рефлюкса из слепой кишки сходна с микробиотой последней [5]. В химусе толстой кишки бактерии составляют в среднем 27% его сухой массы [22]. Анаэробных бактерий (с преобладанием *Escherichia coli*, *Bacterioides fragilis*, *Lactobacilli* и *Bifidobacteria*) в толстой кишке в 1000 раз больше, чем аэробных [5]. Анаэробы представлены грамположительными (*Bifidobacteria*, *Eubacteria*, *Propionibacterium*) и грамотрицательными (*Fusobacterium*, *Enterobacteriaceae*) бактериями. Слизистая оболочка толстой кишки заселена не только симбионтными, но и условно-патогенными бактериями, экспрессирующими уреазу, из семейства *Enterobacteriaceae* [24].

Состав нормальной микробиоты кишечника зависит от диеты [25], возраста, приема антибактериальных препаратов и ряда неконтролируемых состояний [5]. Образованию токсичных веществ в кишечнике способствует преобладание представителей типов *Proteobacteria* и *Fusobacteria* над *Bacterioidetes* при подавлении *Lactobacilli* и *Bifidobacteria* [26]. Количество микроорганизмов в ЖКТ зависит от его

**Таблица 1.** Содержание бактерий в желудочно-кишечном тракте

Отдел желудочно-кишечного тракта	Концентрация, мл <sup>-1</sup>	Объем, мл	Число бактерий
Gaster	≤10 <sup>3</sup> * [5]	250–900**	≤10 <sup>7</sup> *
Duodenum и jejunum	10 <sup>3</sup> –10 <sup>4</sup> **	400**	≤10 <sup>7</sup>
Ileum	10 <sup>8</sup> **	400**	≤10 <sup>11</sup>
Intestinum crassum	10 <sup>11</sup> **	400**	≤10 <sup>14</sup>

\* При pH < 3.0; \*\* [22].

моторики. Транзитное время составляет в норме 10–48 мин для желудка, 2,5–4,0 ч для тонкой кишки [27] и 25–40 ч для толстой кишки [22]. Продолжительность прохождения химуса через толстую кишку определяет наибольший вклад ее микробиоты в образование токсичных веществ [5].

### ТОКСИЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ НОРМАЛЬНОЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ

Нормальная микробиота кишечника продуцирует как необходимые, так и токсичные для хозяина вещества [28]. Справедливость сформулированной И.И. Мечниковым более века назад гипотезы о способности веществ, образованных кишечной микрофлорой из нутриентов, при определенных условиях вызывать системные патологические процессы [29], сегодня полностью доказана. С 2011 по 2021 гг. ежегодное число публикаций, доступных по ключевым словам “*gut barrier*”, “*gut-brain axis*”, “*gut-liver axis*”, “*gut microbiota*”, “*intestinal microflora*”, “*gut microflora*”, “*gut microbiota AND metabolome*”, “*intestinal barrier*”, “*leaky gut syndrome*” и “*human gut microbiome*”, росло экспоненциально. На веб-сайте PubMed.gov оно увеличилось за это время в 7, 16, 17, 18, 23, 30, 34, 37, 40 и 44 раза соответственно, в то время как в предыдущие годы рост был линейным.

Токсичные вещества бактериального происхождения, обладающие системной токсичностью, включают в себя бактериальные экзотоксины, эндотоксин и продукты бактериального преобразования пищевых белков, аминокислот, аминокислот и фосфолипидов (аммиак, амины, фенолы, гетероциклы). Некоторые амины, гетероциклы и фенолы превращаются в печени во вторичные токсиканты (триметиламин-N-оксид, индоксилсульфат, *n*-крезилсульфат), вовлеченные в патогенез сердечно-сосудистых и других хронических заболеваний. Аммиак и эндотоксин, бессимптомно циркулирующие в крови здорового человека в следовых концентрациях, в более высоких концентрациях способны проявлять острую системную токсичность, рассматриваемую ниже.

**Аммиак.** Не менее  $\frac{2}{3}$  аммиака, образующегося в организме, имеет кишечное происхождение. В энтероцитах основной механизм его образования – глутаминовая реакция, а в толстой кишке – метаболическая активность бактерий: дезаминирование аминокислот и азотистых оснований, а также гидролиз мочевины, диффундирующей из крови к люминальной поверхности слизистой оболочки [30]. Уреолитической активностью микроорганизмов, ассоциированных с толстокишечной слизистой оболочкой, обусловлено образование половины аммиака кишечного происхождения [24].

Из кишечного химуса аммиак поступает в общий кровоток как через воротную вену и печень, так и путем трансперитонеальной диффузии [14]. У здорового человека ежедневно в кровь (в основном, портальную) из кишечника доставляется около 4 г аммиака [31]. Его уровень в крови печеночных вен положительно зависит от уровня в портальной крови, а последний – от содержания аммиака в химусе [32]. Благодаря пресистемному метаболизму аммиака, его содержание в крови печеночных вен в 2–3 раза ниже, чем в портальной крови [33] и на порядок ниже, чем в крови брыжеечных вен толстой кишки [5].

В плазме артериальной крови нормальная концентрация аммиака ( $[\text{NH}_3] + [\text{NH}_4^+]$ ) составляет 30 мкМ [34]. Ее увеличение сопряжено с нейротоксичностью, впервые описанной в лаборатории И.П. Павлова [35]. При значениях ( $[\text{NH}_3] + [\text{NH}_4^+]$ ) в плазме крови до 100 мкМ гипераммониемия бессимптомна; при 100–200 мкМ отмечаются рвота, атаксия, раздражительность и гиперактивность, а при >200 мкМ – судороги и кома [36]. При среднем значении объема толстокишечного химуса 0,4 л [22] и содержании аммиака в нем 5,7–39,0 ммоль/л [37], толстокишечный пул аммиака

составляет 2.3–15.6 ммоль/л. При одномоментном равномерном распределении этого количества в 5 л крови, 2 л лимфы и 0.4 л химуса, концентрация аммиака в плазме крови достигла бы 311–2108 мкМ, т. е. значений, значительно превышающих порог комы.

Аммиак поступает в клетки в неионизированной форме,  $\text{NH}_3$ . Учитывая константу основности аммиака ( $pK_a = 9.15$  при  $t = 37^\circ\text{C}$ ), доля аммиака, представленного в форме  $\text{NH}_3$  в плазме крови, имеющей pH 7.36, составляет 1.6%. В цитоплазме pH ниже, что заставляет  $\text{NH}_3$  диффундировать в клетки даже при нормальном суммарном содержании обеих форм аммиака в крови [30]. При метаболическом ацидозе или газовом алкалозе возросшая разность значений pH между плазмой крови и цитоплазмой интенсифицирует поток аммиака в клетки по градиенту концентрации  $\text{NH}_3$  [38]. Это объясняет абсорбцию аммиака из крови головным мозгом, накопление в нем осмотически активного вещества, глутамина, и отек мозга при возрастании содержания аммиака в мозговой ткани [39]. В этом случае нейротоксические эффекты аммиака возможны даже при отсутствии гипераммониемии.

Кроме нейротоксичности, аммиак обладает эндотелиотоксичностью, показанной как *in vitro*, так и *in vivo*. В культивируемых клетках эндотелия капилляров головного мозга он вызывает окислительный стресс, накопление монооксида азота (NO) и продуктов пероксидации арахидоновой кислоты [40, 41], разрушает внеклеточный матрикс, повышает проницаемость плазматической мембраны для флуоресцеин-изотиоцианатного производного декстрана, вызывает экспрессию трансмембранного переносчика аргинина, субстрата NO-синтазы [40]. Культивационная среда эндотелиоцитов, обработанных солью аммония, вызывает набухание культивируемых астроцитов, что показывает вовлеченность сосудистого эндотелия в развитие отека мозга при гипераммониемии [42]. В фагоцитах аммиак активирует толл-подобные рецепторы 4-го типа, что усиливает воспалительный ответ на эндотоксин, образование свободных радикалов кислорода и азота, вызывает набухание и повышение проницаемости эндотелия кровеносных сосудов головного мозга [42].

Гипераммониемия вызывает эндотелий-зависимое NO-опосредованное расширение артериол головного мозга, которое вовлечено в развитие отека мозга и повышения внутричерепного давления при острой печеночной недостаточности [38]. Внутривенное введение кроликам ацетата аммония повышало проницаемость их ГЭБ для полиэтиленгликоля-400 [43]. Повышение проницаемости ГЭБ отмечено и у пациентов с хронической печеночной энцефалопатией [44]. Таким образом, интенсификация поступления аммиака в головной мозг вызывает окислительный стресс, воспалительное повреждение, повышение проницаемости ГЭБ, отек мозга, нарушает регуляцию мозгового кровотока и неврологические функции.

**Эндотоксин.** Содержание в толстокишечном химусе взрослого человека липополисахаридов грамотрицательных бактерий, в сумме известных как “эндотоксин”, близко к 2.5 г/л [45]. В плазме крови оно на девять порядков меньше: 9 нг/л, что является порогом воспалительной активации макрофагов и эндотелиоцитов. Умеренная эндотоксинемия наблюдается при периодонтите, а при сахарном диабете, циррозе печени, болезни Альцгеймера и сепсисе уровень эндотоксина в плазме крови может достигать 500 нг/л [46]. В крови эндотоксин представлен в активной свободной форме или в виде комплексов с белками, обычно не определяемых в лабораторных тестах [17].

Эндотоксин обладает выраженной эндотелиотоксичностью, которая проявляется окислительным стрессом, разрушением гликокаликса, лейкоцитарной адгезией, вазоспазмом, тромбообразованием [47] и повышением проницаемости ГЭБ [48]. При содержании эндотоксина в крови, характерном для сепсиса, возникают “циткиновый шторм” и септический шок [49]. Липополисахариды *Escherichia coli* об-

**Таблица 2.** Публикации, документирующие системную токсичность аммиака и эндотоксина в концентрациях, превышающих физиологическую норму

Проявление системной токсичности	Аммиак	Эндотоксин
Системное воспаление	[42]	[47, 49, 52]
Расстройства кровообращения	[38]	[47, 52]
Коагулопатия	–	[47]
Расстройства легочного газообмена	–	[47, 51, 53, 55]
Почечная недостаточность	–	[58]
Печеночная недостаточность	–	[56, 57]
Острая церебральная недостаточность	[38, 42–44, 60]	[4, 48, 54]

ладают более выраженным провоспалительным действием, чем липополисахариды *Bacteroides dorei* и *Bacteroides vulgatus* [50]. Эндотоксинемия ведет к тромбосан-зависимой легочной вазоконстрикции и легочной гипертензии [51] в сочетании с системной вазодилатацией [52, 53]. Влияние эндотоксина на проницаемость сосудистого эндотелия проявляется повышением проницаемости ГЭБ как для самого эндотоксина, так и для других веществ [4, 54], некардиогенным отеком легких [55], нарушением функций печени [56, 57] и почек [58]. При эндотоксинемии нарушается способность печени вовлекать аммиак в состав мочевины [59]. Профили системной токсичности аммиака и эндотоксина представлены в табл. 2.

## ОЦЕНКА ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭНТЕРОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

Для интегральной оценки проницаемости ЭГБ определяют содержание веществ, вводимых в желудок, в крови или моче. Идеальные маркеры проницаемости — это биохимически инертные вещества, которые преодолевают ЭГБ путем пассивной диффузии. Из веществ, определяемых в моче, предпочтение отдается тем, которые не реабсорбируются в почечных канальцах. В случае повышенной экскреции с мочой этих веществ, постулируется повышенная проницаемость ЭГБ и для других, близких к ним по размерам молекулы [11]. Молекулярный вес, липофильно-гидрофильный баланс ( $\log P_{\text{октанол/вода}}$ ), количество водородных связей, образуемых молекулой, являются априорными показателями преобладания парацеллюлярного или трансцеллюлярного транспорта вещества. Последнему способствует умеренная гидрофильность ( $\log P_{\text{октанол/вода}}$  находится в интервале от 0 до 5) и способность молекулы образовывать не более пяти донорных или акцепторных водородных связей. Молекулярная масса и эффективный молекулярный диаметр вещества используются для оценки размера пор в ЭГБ (табл. 3).

Оценка проницаемости ЭГБ с помощью указанных маркеров исходит из предположения об их преимущественном всасывании в том или ином сегменте ЖКТ. Сахароза используется для оценки проницаемости стенки желудка, а сукралоза — для оценки проницаемости стенки толстой кишки. Однако не исключено, что при патологических состояниях или под воздействием терапии место всасывания меняется. Например, лактулоза и маннитол абсорбируются в основном в тонкой кишке, поскольку в толстой кишке они быстро расщепляются микроорганизмами [65]. Но на фоне подавления последних антибиотиками эти маркеры могут накапливаться в химусе толстой кишки и абсорбироваться ею.

**Таблица 3.** Некоторые маркеры проницаемости энтерогематического барьера

Вещество	Молекулярная масса, Да	Диаметр молекул, нм	log P**	Число водородных связей		Источник ***
				донорных	акцепторных	
Преобладает парацеллюлярный тип проницаемости						
ПЭГ 400*	380–420	0.53	–1.43 (0.61)	2	8	[61]
ПЭГ 4000*	3800–4200	1.00	–0.93 (0.98)	2	80	[61]
Эритритол	122.1	0.86	–3.16 (0.35)	4	0	[62]
Лактулоза	322.3	1.33	–3.92 (0.50)	8	3	[62–64]
Сахароза	342.3	1.31	–3.65 (0.43)	8	3	[62]
ЭДТА (рН 7)	292.2	1.45	–4.43 (1.30)	4	6	[62]
Декстран	3000–20000	5.5–10.0	–	3n + 2	2n + 1	[64]
Преобладает трансцеллюлярный тип проницаемости						
Маннитол	397.6	0.89	–4.96 (0.38)	6	0	[61, 63, 65]
Сукралоза	397.6	1.26	0.88 (0.65)	5	5	[64]

\* При молекулярной массе, указанной в графе 2; \*\* log P<sub>октанол/вода</sub> (ошибка определения); \*\*\* источник, документирующий использование вещества для оценки проницаемости ЭГБ.

Для избирательной оценки проницаемости эпителия слизистой оболочки изолированные петли кишечного сегмента заполняют раствором вещества-маркера, лигируют и инкубируют в буферном растворе. Скорость накопления маркера считается показателем проницаемости эпителия, поскольку кровообращение и, следовательно, сосудистый эндотелий, в этих условиях не функционируют [61]. Барьерная функция сосудистого эндотелия ЖКТ может быть избирательно оценена с помощью красителей (Эванс синий, флуоресцеин) или соединений, меченных радиоактивными изотопами [66]. Прижизненная микроскопия [67] и микроскопия тканей ЖКТ *ex vivo* являются ценным дополнением к прямому изучению транспорта веществ через ЭГБ [68].

### ПОВРЕЖДЕНИЕ ЭНТЕРОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ПРИ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЯХ

**Прямое повреждение ЭГБ ксенобиотиками.** Многие ксенобиотики и их метаболиты прямо повреждают ЭГБ. Местное действие раздражающих и прижигающих веществ запускает каскад патологических процессов, включающий денатурацию белка, тканевой некроз, высвобождение медиаторов воспаления и трансудацию плазмы крови [69]. Этанол [70], мышьяк, соли тяжелых металлов [69, 71], опиоиды [72], ряд микотоксинов [73] проявляют прямую энтеротоксичность. Ее выраженность у нестероидных противовоспалительных препаратов сделала их средством экспериментального моделирования острого гастроэнтерита [74]. Декстран-сульфат и 2,4,6-тринитробензолсульфонат применяют для экспериментального моделирования острого колита [75]. Некоторые микотоксины вызывают воспалительное повреждение ЭГБ, усиливая действие на него эндотоксина [76]. Микотоксины Т-2 и дезоксиниваленол увеличивают проницаемость ЭГБ для полиэтиленгликоля-4000 [77].

Прямая энтеротоксичность возможна не только при пероральном, но и при других путях поступления в организм токсикантов. Эпителий тонкой кишки и, в меньшей степени, желудка и толстой кишки – типичная система клеточного об-

новления с высокой пролиферативной активностью. Это делает его чувствительным к веществам, вызывающим интерфазную или репродуктивную гибель энтероцитов. Различия в энтеротоксическом действии таких веществ определяются только уровнем дифференцировки клеток-мишеней. Адриамицин вызывает апоптоз энтероцитов в 4–5 позиции от стволовой клетки, расположенной в нижней точке межворсинчатой крипты, изопропилметансульфонат, азотистый иприт или актиномицин D – в положении 6–7; фторурацил, милеран, циклофосфамид или циклогексимид – в положении 7–9, винкристин или гидроксимочевина – в положении 10–11 [68]. В достаточной дозе все эти токсиканты вызывают денудацию эпителия тонкой кишки. У крыс с острой интоксикацией циклофосфамидом проницаемость ЭГБ для метиленового синего, маннита и лактулозы увеличивается [63]. Энтеротоксичность цитостатических препаратов при трансплантации стволовых кровяных клеток является одним из факторов, лимитирующих выживаемость пациентов [78].

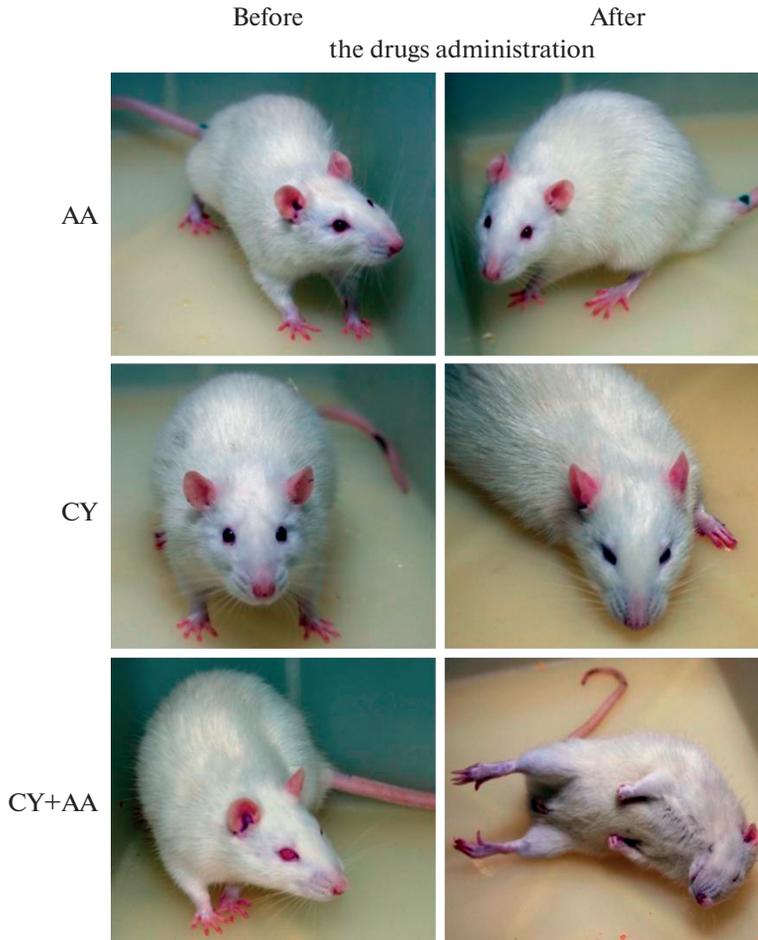
Экспериментально продемонстрирована повышенная проницаемость ЭГБ на фоне его химического повреждения. У крыс, получавших ацетат аммония через желудочный зонд, внутрибрюшинное введение циклофосфамида ускоряло накопление аммиака и глутамина в крови и головном мозгу [79] и провоцировало острые неврологические расстройства: опистотонус и апноэ, характерные для действия солей аммония в гораздо более высоких дозах [80, 81]. При этом изолированное введение соли аммония существенно не влияло на поведение животных (рис. 2).

В приведенных примерах прямое повреждение ЭГБ метаболитами циклофосфамида (альдоциклофосфамидом, акролеином, фосфорамидным ипритом и др.) способствовало поступлению аммиака из химуса в кровь со скоростью, при которой гипераммониемия превышала судорожный порог.

**Повреждение ЭГБ при острой системной гипоксии.** Острая гипоксия кишечника при критических состояниях организма может быть вызвана нарушением внешнего дыхания и кровообращения. При остром тяжелом отравлении такие состояния включают экзотоксический шок, а при отсутствии респираторной поддержки – угнетение дыхательного центра, нервно-мышечную блокаду и бронхообструктивный синдром. В результате “централизации” кровообращения у таких пациентов ЖКТ испытывает более глубокую гипоксию, чем “жизненно важные органы”.

Аэробный тип энергетического метаболизма энтероцитов предрасполагает их к нарушению ресинтеза АТФ при острой гипоксии [82]. Об этом свидетельствует повреждение кишечника во время высотной гипоксии, проявляющееся воспалением, изъязвлением, кровотечением, осложняющими высотную болезнь [83]. Нормобарическая гипоксия провоцировала увеличение проницаемости ЭГБ у крыс при беге на тредмилле [84]. Проницаемость ЭГБ увеличивается при гемолитической анемии [85] и острой кровопотере [86]. Разобшение окислительного фосфорилирования в колоноцитах нарушает их резистентность к *Escherichia coli* [87]. Мыши с более активным окислительным фосфорилированием в слизистой оболочке толстой кишки более устойчивы к местному токсическому действию декстрансульфата или тринитробензолсульфоната [88]. При гипоксии снижается образование муцина в кишечнике, что приводит к воспалительным изменениям слизистой оболочки. Подслизистое гемакапиллярное сплетение в тонкой кишке более развито, чем в толстой, что объясняет более высокую чувствительность последней к ишемии [89].

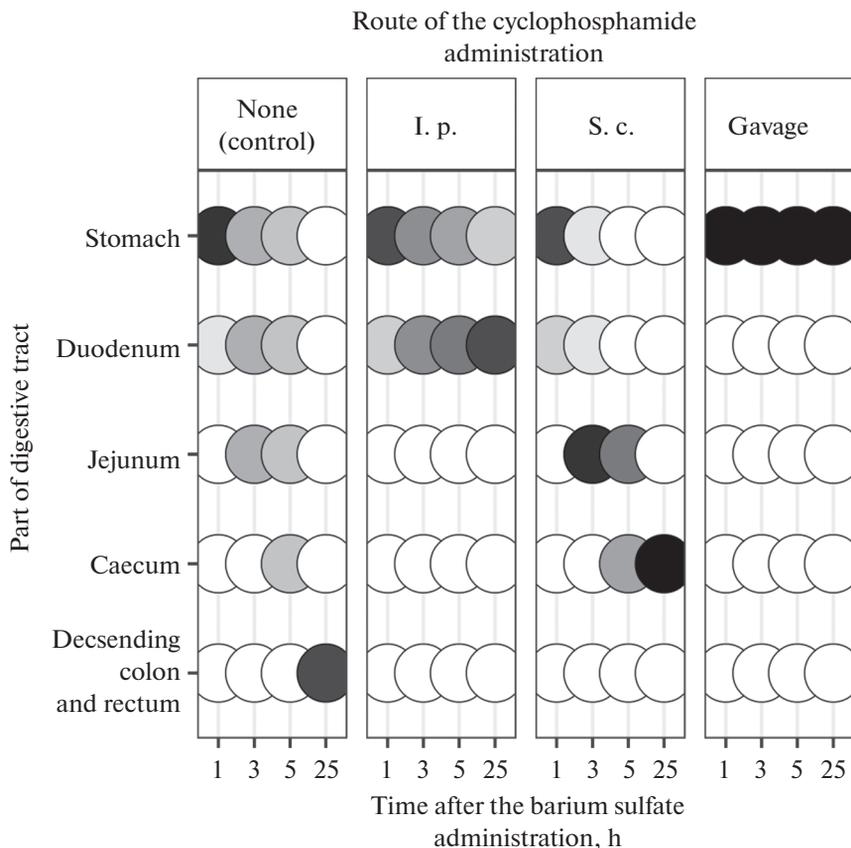
**Повреждение ЭГБ при гладкомышечном спазме.** Спазм гладкой мускулатуры ЖКТ является характерным симптомом отравления ингибиторами холинэстеразы и серотонинергическими препаратами, но также может быть реакцией на “централизацию” кровообращения, или результатом действия на гладкую мускулатуру серотонина, продуцируемого *Enterobacteria* [90]. Серотонинергическая стимуляция



**Рис. 2.** Симптомы острой интоксикации ацетатом аммония и (или) циклофосфаном у крыс. Животные сфотографированы через 30 мин после внутрижелудочного введения ацетата аммония (AA) в дозе 12 ммоль/кг и (или) внутрибрюшинного введения циклофосфана (СУ) в дозе 1000 мг/кг [81].

толстой кишки сопровождается, помимо спазма ее собственной гладкой мускулатуры, артериальным спазмом и местной циркуляторной гипоксией [91]. Нарушение микроциркуляции в кишечнике может повредить его так же, как это происходит при системной гипоксии. Выдвинута гипотеза о триаде “мышечный спазм, ишемия и боль” как факторе повышенной проницаемости ЭГБ при синдроме раздраженного кишечника [90]. При остром отравлении реакция ЭГБ на такие изменения может быть аналогичной.

**Повреждение ЭГБ при желудочно-кишечном стазе.** Желудочно-кишечный стаз является потенциально летальным осложнением у пациентов отделений интенсивной терапии [92]. Это одно из специфических проявлений токсичности опиоидов, холинергических антагонистов и агонистов серотонина [11]. Он наблюдался у крыс при моделировании барбитуратной комы [93], а также при острых отравлениях алкилирующими токсикантами. На рис. 3 показано расположение рентгенологической тени сульфата бария у крыс, получивших суспензию сульфата бария через



**Рис. 3.** Схема расположения рентгенологической тени сульфата бария в ЖКТ крыс после введения циклофосфана и бариевой взвеси. Тон кружков пропорционален доле площади тени рентгеноконтрастного вещества в соответствующем отделе ЖКТ в площади всей наблюдаемой тени сульфата бария. Черные кружки: 75–100%. Белые кружки: отсутствие тени [94].

зонд тотчас после внутрибрюшинного (*i. p.*), подкожного (*s. c.*) или внутримышечного (*gavage*) введения циклофосфида в дозе 1000 мг/кг [94]. Налицо резкое угнетение пропульсивной активности всех отделов ЖКТ, наиболее выраженное при внутримышечном введении токсиканта.

При желудочно-кишечном стазе вегетация бактерий не компенсируется их удалением, в результате чего тип взаимоотношений нормальной кишечной микрофлоры с хозяином перестает быть мутуалистическим и приближается к паразитизму. Увеличивается не только суммарная люминальная концентрация продуцируемого бактериями аммиака ( $[\text{NH}_3] + [\text{NH}_4^+]$ ), но и рН химуса, а, следовательно, и доля аммиака, представленного в высокопенетрантной форме  $\text{NH}_3$  [37]. Цитотоксическое действие  $\text{NH}_3$  сокращает жизненный цикл колоноцитов [95] и продукцию муцина [96], что может повреждать ЭГБ и повышать биодоступность веществ, продуцируемых микрофлорой толстой кишки.

Значительное газообразование, характерное для желудочно-кишечного стаза, может интенсифицировать диффузию веществ через ЭГБ. Оно повышает баромет-

рическое давление в просвете кишечника и согласно первому закону Дальтона — парциальное давление паров летучих веществ. Согласно второму закону Дальтона это увеличивает напряжение соответствующих газов, растворенных в химусе. Повреждение ЭГБ и повышенное напряжение летучих веществ в химусе — потенциальные факторы повышения их биодоступности при желудочно-кишечном стазе.

**Воспалительное повреждение ЭГБ.** Повреждение ЭГБ экзогенным токсикантом способствует поступлению в кровь эндотоксина. Он стимулирует секрецию фагоцитами провоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$  и ИЛ-6), что ведет как к системному, так и к местному воспалению [97]. Введение циклофосфида карликовым свиньям в дозе 50 мг/кг увеличивало содержание ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6 в сыворотке крови и проницаемость ЭГБ [98]. Кишечный мукозит ведет к бактериемии у реципиентов кроветворных стволовых клеток при цитостатической терапии [99]. Сообщалось о воспалении подслизистой оболочки и лейкоцитокластическом васкулите, сопровождавшемся изъязвлением слизистой оболочки у крыс, которым вводили хлорид ртути [100]. Острое воспаление толстой кишки провоцирует воспаление и в других органах [101], что может способствовать поступлению в них из крови токсичных веществ кишечного происхождения.

Таким образом, при острых тяжелых отравлениях возникают предпосылки к увеличению проницаемости ЭГБ для метаболитов и клеточных компонентов микрофлоры кишечника. Механизмы вторичной дисфункции ЭГБ при острых отравлениях включают прямое повреждающее действие ксенобиотиков или их метаболитов, желудочно-кишечный стаз, гладкомышечный спазм, воспаление и гипоксию ЖКТ. Наряду со вторичной дисфункцией ЭГБ, доставке токсичных веществ из кишечного химуса в общий кровоток при остром отравлении могут способствовать избыточный рост кишечной микробиоты и повышенное газообразование. Перечисленные синергические факторы ведут к эндотоксемии.

## ЭНДОТОКСЕМИЯ ПРИ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЯХ

Эндотоксемия — повышенное содержание в крови биологически активных веществ, образующихся в организме. Исходя из представлений об организме как об экосистеме, частью которой является кишечная микробиота [5, 6], соединения, продуцируемые последней, классифицируются как эндогенные вещества.

В качестве интегрального показателя эндотоксемии пользуются содержанием в крови веществ средней молекулярной массы [102]. У пациентов с неосложненным отравлением психофармакологическими препаратами среднее содержание в крови таких веществ превышало таковое у здоровых доноров на 32%, а эндотоксина — в 10 раз [103]. После кишечного лаважа уровень веществ средней молекулярной массы в крови снизился на 18%, эндотоксина — вдвое, а без лаважа эти показатели эндотоксемии продолжали расти. Таким образом, при отравлениях психофармакологическими препаратами химус толстой кишки является источником эндотоксемии.

Представляет интерес вопрос о том, какие конкретно вещества вовлечены в формирование эндотоксемии при остром отравлении. Одно из них — эндотоксин, повышенное содержание которого в крови показано при тяжелом остром отравлении колхицином [97], верапамилом [104], этанолом [105]. Выраженная эндотоксемия сопровождает подготовку пациентов к трансплантации стволовых кроветворных клеток, при которой цитостатические препараты вводят в потенциально летальных дозах. Накопление эндотоксина в крови при таком лечении ведет к системной воспалительной реакции [106, 107].

Одновременно с эндотоксинемией при острых экзогенных отравлениях возникает гипераммониемия [108, 109]. Ниже перечислены ксенобиотики, при острых отравлениях которыми она документирована (для исключения поражения печени

из числа причин гипераммониемии не указаны специфические гепатотоксические агенты):

- ацетазолamid [110];
- кальция гопантенат [111];
- клозапин [112];
- кокаин [113];
- циклофосфан [79];
- циклопропан [114];
- цианиды [115];
- этанол [116];
- диэтиловый эфир [117];
- фторацетат [118];
- 5-фторурацил [119];
- гомоцистеина тиолактон [120];
- соли свинца [121];
- метанол [122];
- кислород [123];
- тиопентал натрия [93];
- триметоприм [124];
- вальпроаты [125].

Таким образом, в эндотоксемию при острых отравлениях вовлечены эндотоксин и аммиак, в то время как изменения содержания в крови других компонентов кишечно-метаболизма требуют изучения. Роль эндотоксина и аммиака в патогенезе острых осложнений характеризуют приведенные ниже сведения об эндотоксемии при соответствующих синдромах различной этиологии.

### ЭНДОТОКСЕМИЯ ПРИ КРИТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ ОРГАНИЗМА

Критические состояния организма являются паттернами эндотоксикоза – совокупности клинических проявлений эндотоксемии. Роль эндотоксина и аммиака в патогенезе критических состояний организма рассматривается ниже в зависимости от того, воспроизводятся ли симптомы этих состояний введением в организм эндотоксина или аммиака.

**Шок** – острое состояние недостаточного кровоснабжения тканей, одним из биохимических маркеров которого является гипераммониемия. Уровень аммиака многократно повышен в плазме крови и ткани головного мозга кроликов и собак при моделировании теплового или инсулинового шока [126]. У пациентов с септическим шоком уровень аммиака в плазме венозной крови был на 80% выше, а у впоследствии погибших от септического шока – в 2.2 раза выше, чем у пациентов с сепсисом, но без шока [127]. У пациентов с геморрагическим шоком уровень аммиака в плазме артериальной крови был вдвое выше, чем у пациентов с кровотечением, но без шока [128]. При тяжелой травме уровень аммиака в плазме венозной крови был вдвое выше, чем в контроле, а у погибших пациентов – на 70% выше, чем у выживших [129]. Концентрация аммиака в плазме крови пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии в связи с остановкой сердца, была в 4.8 раза выше, чем у пациентов со спонтанным кровообращением [130]. Гипераммониемия не только сопровождает шок, но и вовлечена в его патогенез. Введением солей аммония кроликам воспроизводятся основные проявления теплового и инсулинового шока [126].

В эксперименте шок воспроизводится и введением эндотоксина [131]. Накопление эндотоксина в крови характерно для септического [132], травматического и геморрагического [133] шока.

Повреждение ЭГБ является одним из механизмов эндотоксемии при шоке. При моделировании на крысах геморрагического шока животные теряли с мочой клаудин-3, белок плотных контактов кишечного эпителия [134]. При использовании в качестве маркеров эндотоксемии веществ средней молекулярной массы показано, что при геморрагическом шоке они накапливаются вначале в тканях кишечника, затем – в портальной крови и, наконец, в крови из сонной артерии [135].

Таким образом, гипераммониемия и эндотоксинемия характерны для эндотоксемии, сопровождающей шок, и вовлечены в развитие шока различного типа.

**Сепсис** – системный воспалительный ответ на эндотоксинемию и бактериемию, наиболее часто осложняющий острые отравления у лиц с алкогольной зависимостью [105]. Сепсис развивался у 6,4% пострадавших от отравления метанолом [136]. Эндотоксинемия – постоянная находка при сепсисе [137], в то время как бактериемия наблюдалась лишь у 67% таких пациентов [138]. Накопление в крови эндотоксина возникает при сепсисе, вызванном не только грамотрицательными, но и грамположительными бактериями, а также грибами, что обусловлено повреждением ЭГБ [139].

Клинические проявления сепсиса воспроизводятся введением животным эндотоксина [140]. При эндотоксинемии, характерной для сепсиса, активируется каскад свертывания крови и возникает диссеминированное микрососудистое тромбообразование [141], что ведет к поражению почек [10], сердца и печени [142], мультиорганной недостаточности [132] и отеку легких [143].

Аммиак также вовлечен в патогенез мультиорганной недостаточности при сепсисе. Его концентрация в плазме крови пациентов с этим диагнозом, измеренная при поступлении в приемное отделение, положительно коррелировала с вероятностью развития у них мультиорганной недостаточности в последующее 28 дней [96].

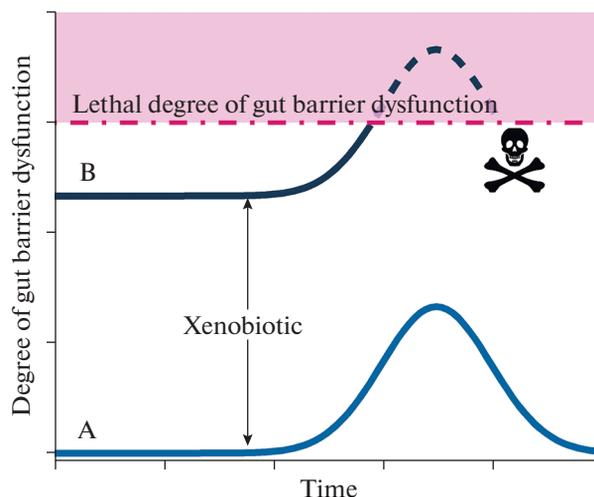
**Вторичные острые повреждения легких** при острых отравлениях включают в себя некардиогенный отек легких, синдромы шокового и влажного легкого. Вовлеченность эндотоксина в патогенез этих состояний следует из эндотоксинемии при них [144] и повреждения клеток альвеолярно-капиллярного барьера эндотоксином как *in vitro* [145], так и *in vivo* [146]. Введение крысам эндотоксина вызывает острое повреждение легких, напоминающее таковое при COVID-19 и проявляющееся кровоизлиянием в полость альвеол, цитокиновым штормом, коагулопатией и легочной гипертензией [147]. Эндотоксин *Escherichia coli* вызывал гемодинамические нарушения в легких у свиней: его введение в полость правого предсердия повышало давление крови в легочной артерии [53].

При порта-кавальном анастомозе предиктором легочной гипертензии является гипераммониемия [148]. У пациентов с тяжелым острым панкреатитом развитие летального осложнения – отека легких – обусловлено чрезмерной бактериальной колонизацией тонкой кишки [149].

Таким образом, эндотоксинемия сопровождает вторичные острые поражения легких при острых отравлениях и вовлечена в развитие легочной гипертензии. Другим маркером эндотоксемии, перспективным для прогнозирования вторичных острых поражений легких при острых отравлениях, является аммиак.

**Острая церебральная недостаточность** – синдром, возникающий в результате диффузного поражения головного мозга. Наблюдается при тяжелом отравлении веществами с различным механизмом действия, проявляется нарушением и спутанностью сознания, двигательными расстройствами, ускоренным катаболизмом, острыми нарушениями дыхания и кровообращения [150].

Некоторые проявления острой церебральной недостаточности могут быть связаны с повышенной доставкой аммиака и (или) эндотоксина в головной мозг. Гипераммониемия характерна для острой печеночной недостаточности, осложненной отеком мозга и повышением внутричерепного давления [151]. Внутричерепное



**Рис. 4.** Влияние хронической дисфункции энтерогематического барьера на исход острого экзогенного отравления. А — отсутствие, В — наличие преформированной хронической дисфункции энтерогематического барьера.

давление, неврологические расстройства и летальность положительно связаны с уровнями аммиака в сыворотке крови у пациентов с внепеченочной гипераммониемией [45]. Содержание аммиака в плазме крови и ткани мозга значительно повышено при моделировании диабетической комы на собаках и крысах [126]. Эндотоксин повышал чувствительность поросят к острой церебральной гипоксии. Введение эндотоксина *Escherichia coli* поросятам усиливало потерю нейронов, метаболические нарушения и увеличивало вероятность смерти мозга с последующей окклюзией сонной артерии [152]. Введение эндотоксина хорькам усугубило повреждение головного мозга из-за окклюзии сонной артерии [153]. Эндотоксин потенцировал отек мозга во время высотной гипоксии [154].

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что эндотоксин и аммиак, продуцируемые нормальной микробиотой кишечника, вовлечены в патогенез патологических состояний, которые могут осложнять острые отравления: шок, сепсис, вторичные острые поражения легких и острую церебральную недостаточность.

#### ВТОРИЧНАЯ ДИСФУНКЦИЯ ЭНТЕРОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА И СТОХАСТИЧНОСТЬ ОСЛОЖНЕНИЙ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ

Феномен изменения переносимости острых повреждающих воздействий на фоне преформированной хронической патологии давно используется в функциональной диагностике последней. Этот феномен возможен и при острых отравлениях. Повреждение ЭГБ ксенобиотиком может накладываться на хронические патологические состояния, при которых он поврежден, такие как “кишечный дисбиоз”, “синдром раздраженного кишечника”, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит и др. Это может усиливать эндотоксемию при острых экзогенных отравлениях. Такое наложение, схематически показанное на рис. 4, может вносить вклад в индивидуальную вариабельность тяжести их осложнений.

ЗАЩИТА ЭНТЕРОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА  
ПРИ ОСТРЫХ ЭКЗОГЕННЫХ ОТРАВЛЕНИЯХ

Кишечный химус является агрессивной средой для поврежденной слизистой оболочки кишечника. Местное повреждающее действие на нее возрастает при кишечном дисбиозе [95]. Поэтому плановые меры защиты ЭГБ должны быть направлены на оптимизацию состава кишечной микробиоты и повышение местной резистентности слизистой оболочки к токсичным веществам бактериального происхождения. Основными подходами к оптимизации состава кишечной микробиоты являются пребиотико-, метабиотико-, пробиотико- и аутопробиотикотерапия.

Пребиотики – нутриенты, избирательно способствующие вегетации полезных для хозяина представителей микробиоты; примером терапевтического действия таких веществ может служить восстановление кишечной микробиоты у мышей и морских свинок с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом [155]. Вариантом пребиотикотерапии является метабиотикотерапия – применение метаболитов функциональных микроорганизмов. Метаболиты *Lactobacillus plantarum* ускоряли восстановление кишечной микробиоты у мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом в 5965 раз и у морских свинок – в 308 раз. Применение на этих же экспериментальных моделях пребиотика Стимбифид (комплекса фруктоолиго- и фруктополисахаридов) ускоряло восстановление кишечной микробиоты в 7118 и 1047 раз соответственно [155].

Пробиотики – препараты функциональных микроорганизмов, относящихся к коллекционным штаммам. Классическим примером пробиотикотерапии может служить использование предложенной И.И. Мечниковым *Lactobacillus bulgaricus* [29]. Широко применяются с этой целью препараты живых *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Bifidobacteria* и *E. coli* [156]. Анаэробные грамположительные бактерии: *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Propionobacteria* – подавляют условно-патогенные микроорганизмы кишечника, выработку аммиака, аминов, субстратов для синтеза триметиламин-*N*-оксида, индоксилсульфата, *n*-крезилсульфата, обладающих как системной, так и местной токсичностью [45]. В качестве источника пробиотических микроорганизмов применимы содержащие их официальные микробиологические препараты. Вместе с тем отмечается неспособность таких микроорганизмов к участию в формировании “микробно-тканевого комплекса” и длительной колонизации кишечника человека [155]. В связи с этим перспективна аутопробиотикотерапия – применение определенных аборигенных бактерий, выделенных из организма и возвращенных в него после культивирования и накопления *in vitro*. Показана терапевтическая эффективность при экспериментальном дисбиозе используемых таким образом *Enterococci* [157] и *Bifidobacteria* [158].

С целью повышения местной устойчивости кишечника к токсичным веществам бактериального происхождения перспективны малотоксичные препараты, пригодные для длительного применения. Перспективен их поиск среди препаратов, обладающих адаптогенными свойствами. Экспериментально показана эффективность сока подорожника как средства коррекции острых гипергаммонемического и нейротоксического эффектов циклофосамида. На фоне всего лишь однократного внутривенного введения крысам официального препарата сока подорожника в дозе, эквивалентной 47 мл для человека, гипергаммонемический эффект циклофосамида, введившегося в супралетальной дозе, 2.1 ЛД<sub>50</sub>, снижался в полтора раза, на 20% возрастала средняя продолжительность виса животных на проволочной решетке, на 30% – средняя продолжительность их жизни [159].

Перспективными средствами экстренной профилактики поражения ЭГБ являются препараты, способные образовывать на слизистой оболочке экранирующую пленку. Такими веществами могут быть пектины, адгезивные свойства которых

используются в гидроколлоидных пластырях для ран [160]. При пероральном введении пектина на слизистых оболочках образуется защитная пленка из пектатов кальция [75], препятствующая попаданию в кровь веществ, образованных микрофлорой. Желатина таннат обладает аналогичной способностью [161]. Защитный эффект этих веществ ожидается преимущественно во время транзита препарата в тонкой кишке: с 10 мин до 5 ч после приема внутрь.

Необходимыми условиями поддержания барьерной функции кишечника при тяжелых острых отравлениях являются устранение его гипоксии и воспаления. Это подтверждается противовоспалительным действием гипербарической оксигенации при сепсисе [162]. Перспективны клинические испытания газовых смесей, обогащенных кислородом, содержащих инертные газы, оксид азота или водород в малых концентрациях; свойства этих добавок могут модулировать эффекты кислородной терапии. Ксенон, оксид азота и водород обладают нейропротекторными и кардиотоническими свойствами, аргон и сероводород – только нейрозащитными свойствами [163]. Противовоспалительные препараты могут быть дополнением к оксигенотерапии: при экспериментальном моделировании сепсиса дисфункция ЭГБ и эндотоксемия предотвращались введением гидрокортизона [164].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Химус кишечника здорового человека содержит продукты бактериального происхождения, количество и профиль системной токсичности которых при потере градиентов их концентрации между химусом и кровью обеспечивают формирование критических состояний организма: шока, сепсиса, вторичных острых поражений легких и острой церебральной недостаточности.

2. При тяжелых острых экзогенных отравлениях создаются предпосылки ко вторичной дисфункции энтерогематического барьера и эндотоксемии кишечного происхождения.

3. Эндотоксемия, включающая эндотоксинемию и гипераммониемию, вовлечена в формирование осложнений острого отравления, проявляющихся критическими состояниями организма, перечисленными в пункте 1.

4. Плановые меры защиты энтерогематического барьера от повреждения при последующем остром отравлении должны быть направлены на оптимизацию состава кишечной микробиоты, подавление образования ею цитотоксических веществ и повышение местной кишечной резистентности путем назначения малотоксичных препаратов, рассчитанных на длительное применение.

5. Основными подходами к оптимизации состава кишечной микробиоты являются пребиотико-, метабиотико-, пробиотико- и аутопробиотикотерапия. Для повышения местной устойчивости кишечника к токсичным веществам бактериального происхождения перспективны малотоксичные препараты, обладающие адаптогенными свойствами и пригодные для длительного применения.

6. Экстренная профилактика вторичной дисфункции энтерогематического барьера предусматривает применение препаратов, экранирующих слизистую оболочку от химуса, устраняющих гипоксию и воспаление кишечника.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет известных им конкурирующих финансовых интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, описанную в этой статье.

### ВКЛАД АВТОРОВ

Ю.Ю.И. — формулировка основных идей, определение ее цели и структуры; обобщений и выводов. Т.В.Ш. — участие в написании всех разделов текста обзорной статьи, поиск и анализ научной литературы по ее тематике. В.Л.Р. — участие в написании текста раздела статьи “Повреждение энтерогематического барьера при острых отравлениях”, поиск и анализ научной литературы по тематике обзорной статьи. О.А.В. — участие в поиске и анализе научной литературы по тематике обзорной статьи; оформление текста статьи и списка литературы.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны бывшему начальнику кафедры военной токсикологии и медицинской защиты профессору Сергею Алексеевичу Куценко — за авторский экземпляр монографии “Основы токсикологии” [69], материалы которой были чрезвычайно полезны при обсуждении избирательной токсичности ксенобиотиков; консультанту НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова профессору Кассинии Валентиновне Яременко за любезное согласие поделиться ее бесценным клиническим опытом в профилактике энтеротоксичности цитостатических агентов. Авторы также благодарны анонимным рецензентам их предыдущей статьи [3] за подробное обсуждение физиологической активности веществ, продуцируемых нормальной кишечной микрофлорой, и анонимному рецензенту настоящей статьи — за помощь в освещении аспектов проблемы, связанных с составом кишечной микробиоты.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Grishin SM* (2018) Crimes committed by medical workers as a result of improper performance of their professional duties (based on the case-law of the European part of Russia 2015–2017). *Medicina (Mex)* 6: 1–14.  
<https://doi.org/10.29234/2308-9113-2018-6-1-1-14>
2. *Ponti G, Maccaferri M, Ruini C, Tomasi A, Ozben T* (2020) Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. *Crit Rev Clin Lab Sci* 57: 389–399.  
<https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1770685>
3. *Ivitsky JuJu, Schäfer TV, Rejniuk VL, Golovko AI* (2022) Endogenous humoral determinants of vascular endothelial dysfunction as triggers of acute poisoning complications. *J Appl Toxicol* Online ahead of print.  
<https://doi.org/10.1002/jat.4312>
4. *Vutukuri R, Brunkhorst R, Kestner R-I, Hansen L, Bouzas NF, Pfeilschifter J, Devraj K, Pfeilschifter W* (2018) Alteration of sphingolipid metabolism as a putative mechanism underlying LPS-induced BBB disruption. *J Neurochem* 144: 172–185.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.14236>
5. *Hill MJ* (1995) Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology. London Bristol PA. Taylor & Francis.
6. *Tang WHW, Kitai T, Hazen SL* (2017) Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res* 120: 1183–1196.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309715>
7. *Choi T-Y, Choi YP, Koo JW* (2020) Mental Disorders Linked to Crosstalk between The Gut Microbiome and The Brain. *Exp Neurobiol* 29:403–416.  
<https://doi.org/10.5607/en20047>
8. *Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Bruno G, Petito V, Franceschi F, Gasbarrini A* (2015) The therapeutic management of gut barrier leaking: the emerging role for mucosal barrier protectors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19: 1068–1076.
9. *Gurwara S, Dai A, Ajami NJ, Graham DY, White DL, Chen L, Jang A, Chen E, El-Serag HB, Petrosino JF, Jiao L* (2020) Alcohol use alters the colonic mucosa-associated gut microbiota in humans. *Nutr Res* 83: 119–128.  
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.09.004>
10. *Liu Z, Yang D, Gao J, Xiang X, Hu X, Li S, Wu W, Cai J, Tang C, Zhang D, Dong Z* (2020) Discovery and validation of miR-452 as an effective biomarker for acute kidney injury in sepsis. *Theranostics* 10: 11963–11975.  
<https://doi.org/10.7150/thno.50093>
11. *Gad SC* (2018) Toxicology of the Gastrointestinal Tract. Boca Raton, Florida : CRC Press.
12. *Lechuga S, Naydenov NG, Feygin A, Cruise M, Ervasti JM, Ivanov AI* (2020) Loss of  $\beta$ -Cytosolic Actin in the Intestinal Epithelium Increases Gut Barrier Permeability *in vivo* and Ex-

- aggerates the Severity of Experimental Colitis. *Front Cell Dev Biol* 8: 588836.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.588836>
13. *Magnotti LJ, Upperman JS, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA* (1998) Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock. *Ann Surg* 228: 518–527.  
<https://doi.org/10.1097/00000658-199810000-00008>
  14. *Schäfer TV, Ivnitsky JuJu, Rejniuk VL* (2011) Cyclophosphamide-induced leakage of gastrointestinal ammonia into the common bloodstream in rats. *Drug Chem Toxicol* 34: 25–31.  
<https://doi.org/10.3109/01480545.2010.483518>
  15. *Milan Manani S, Virzi GM, Giuliani A, Baretta M, Corradi V, De Cal M, Biasi C, Crepaldi C, Ronco C* (2020) Lipopolysaccharide Evaluation in Peritoneal Dialysis Patients with Peritonitis. *Blood Purif* 49: 434–439.  
<https://doi.org/10.1159/000505388>
  16. *Møller S, Kimer N, Barløse M, Bendtsen F* (2020) Pathophysiological-based treatments of complications of cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 55: 383–394.  
<https://doi.org/10.1080/00365521.2020.1744709>
  17. *Комаров БД, Лужников ЕА, Шиманко ИИ* (1981) Хирургические методы лечения острых отравлений. М. Медицина. [*Komarov BD, Luzhnikov EA, Shimanko II* (1981) Surgical treatments for acute poisoning. Moscow. Meditsina. (In Russ)].
  18. *Shi K, Wang F, Jiang H, Liu H, Wei M, Wang Z, Xie L* (2014) Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients. *Dig Dis Sci* 59: 2109–2117.  
<https://doi.org/10.1007/s10620-014-3202-7>
  19. *Travis S, Menzies I* (1992) Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clin Sci* 82: 471–488.  
<https://doi.org/10.1042/cs0820471>
  20. *Самойлов ВО* (2013) Медицинская биофизика. Санкт-Петербург. СпецЛит. [*Samoilov VO* (2013) Medical biophysics. Saint-Petersburg. Spezlit. (In Russ)].
  21. *Lin HC, Pimentel M* (2005) Bacterial concepts in irritable bowel syndrome. *Rev Gastroenterol Disord* 5(3): S3–S9.
  22. *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>
  23. *Hunt RH, Camilleri M, Crowe SE, El-Omar EM, Fox JG, Kuipers EJ, Malfertheiner P, McColl KEL, Pritchard DM, Ruge M, Sonnenberg A, Sugano K, Tack J* (2015) The stomach in health and disease. *Gut* 64: 1650–1668.  
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307595>
  24. *Walker V* (2012) Severe hyperammonaemia in adults not explained by liver disease. *Ann Clin Biochem Int J Lab Med* 49: 214–228.  
<https://doi.org/10.1258/acb.2011.011206>
  25. *Adamberg K, Jaagura M, Aaspõllu A, Nurk E, Adamberg S* (2020) The composition of faecal microbiota is related to the amount and variety of dietary fibres. *Int J Food Sci Nutr* 71: 845–855.  
<https://doi.org/10.1080/09637486.2020.1727864>
  26. *Rai R, Saraswat VA, Dhiman RK* (2015) Gut Microbiota: Its Role in Hepatic Encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol* 5: S29–S36.  
<https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.12.003>
  27. *O'Grady J, Murphy CL, Barry L, Shanahan F, Buckley M* (2020) Defining gastrointestinal transit time using video capsule endoscopy: a study of healthy subjects. *Endosc Int Open* 8: E396–E400.  
<https://doi.org/10.1055/a-1073-7653>
  28. *Rodríguez-Hernández P, Cardador MJ, Arce L, Rodríguez-Estévez V* (2020) Analytical Tools for Disease Diagnosis in Animals via Fecal Volatilome. *Crit Rev Anal Chem* 1–16.  
<https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1843130>
  29. *Метchnikoff Е* (1907) *Essais optimistes*. Paris. A. Maloine
  30. *Ивницкий ЮЮ, Шефер ТВ, Рейнюк ВЛ* (2012) Эндогенный аммиак в токсическом процессе. *Palmarium Acad Publish*. [*Ivnitsky JuJu, Schäfer TV, Rejniuk VL* (2012) Endogenous ammonia in a toxic process. *Palmarium Acad Publish*. (In Russ)].
  31. *Summerskill WHJ, Wolpert E* (1970) Ammonia Metabolism in the Gut. *Am J Clin Nutr* 23: 633–639.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/23.5.633>
  32. *Gips CH, Qué GS, Wibbens-Alberts M* (1973) The arterial ammonia curve after oral and intraduodenal loading with ammonium acetate. Absorption in the stomach. *Neth J Med* 16: 14–17.
  33. *Dobson GP, Veech RL, Passonneau JV, Huang MT* (1990) In vivo portal-hepatic venous gradients of glycogenic precursors and incorporation of D-[3-<sup>3</sup>H]glucose into liver glycogen in the awake rat. *J Biol Chem* 265: 16350–16357.

34. *Ali R, Nagalli S* (2021) Hyperammonemia. *StatPearls Publ.*
35. *Hahn M, Massen O, Nencki M, Pawlow J* (1893) Die Eck'sche Fistel zwischen der unteren Hohlvene und der Pfortader und ihre Folgen für den Organismus. *Arch Für Exp Pathol Pharmacol* 32: 161–210.  
<https://doi.org/10.1007/BF01995065>
36. *Pagana K, Pagana T, Pagana T* (2021) *Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests*. 7th ed. Philadelphia. Elsevier Inc.
37. *Agostini L, Down PF, Murison J, Wrong OM* (1972) Faecal ammonia and pH during lactulose administration in man: comparison with other cathartics. *Gut* 13: 859–866.  
<https://doi.org/10.1136/gut.13.11.859>
38. *Scott TR* (2013) Pathophysiology of cerebral oedema in acute liver failure. *World J Gastroenterol* 19: 9240.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i48.9240>
39. *Ott P, Vilstrup H* (2014) Cerebral effects of ammonia in liver disease: current hypotheses. *Metab Brain Dis* 29: 901–911.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-014-9494-7>
40. *Skowrońska M, Albrecht J* (2013) Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Neurochem Int* 62: 731–737.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.10.013>
41. *Tranah TH, Vijay GKM, Ryan JM, Shawcross DL* (2013) Systemic inflammation and ammonia in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 28: 1–5.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-012-9370-2>
42. *Jayakumar AR, Norenberg MD* (2018) Hyperammonemia in Hepatic Encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol* 8: 272–280.  
<https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.06.007>
43. *McClung HJ, Sloan HR, Powers P, Merola AJ, Murray R, Kerzner B, Pollack JD* (1990) Early changes in the permeability of the blood-brain barrier produced by toxins associated with liver failure. *Pediatr Res* 28: 227–231.  
<https://doi.org/10.1203/00006450-199009000-00014>
44. *Ochoa-Sanchez R, Rose CF* (2018) Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease. *J Clin Exp Hepatol* 8: 262–271.  
<https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.08.001>
45. *Bested AC, Logan AC, Selhub EM* (2013) Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Mechnikoff to modern advances: Part II – Contemporary contextual research. *Gut Pat-hog* 5: 3.  
<https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-3>
46. *Brown GC* (2019) The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 16: 180.  
<https://doi.org/10.1186/s12974-019-1564-7>
47. *Iba T, Levy JH, Hirota T, Hiki M, Sato K, Murakami T, Nagaoka I* (2018) Protection of the endothelial glycocalyx by antithrombin in an endotoxin-induced rat model of sepsis. *Thromb Res* 171: 1–6.  
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.09.042>
48. *Minami T, Oda K, Gima N, Yamazaki H* (2007) Effects of lipopolysaccharide and chelator on mercury content in the cerebrum of thimerosal-administered mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 24: 316–320.  
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.08.004>
49. *Pfalzgraff A, Weindl G* (2019) Intracellular Lipopolysaccharide Sensing as a Potential Therapeutic Target for Sepsis. *Trends Pharmacol Sci* 40: 187–197.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.01.001>
50. *Yoshida N, Yamashita T, Kishino S, Watanabe H, Sasaki K, Sasaki D, Tabata T, Sugiyama Y, Kitamura N, Saito Y, Emoto T, Hayashi T, Takahashi T, Shinohara M, Osawa R, Kondo A, Yamada T, Ogawa J, Hirata K* (2020) A possible beneficial effect of Bacteroides on faecal lipopolysaccharide activity and cardiovascular diseases. *Sci Rep* 10: 13009.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-69983-z>
51. *Wideman RF, Erf GF, Chapman ME* (2001) Intravenous Endotoxin Triggers Pulmonary Vasoconstriction and Pulmonary Hypertension in Broiler Chickens. *Poult Sci* 80: 647–655.  
<https://doi.org/10.1093/ps/80.5.647>
52. *Bermejo-Martín J, Martín-Fernández M, López-Mestanza C, Duque P, Almansa R* (2018) Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease). *J Clin Med* 7: 400.  
<https://doi.org/10.3390/jcm7110400>
53. *Corrêa TD, Pereira AJ, Takala J, Jakob SM* (2020) Regional venous-arterial CO<sub>2</sub> to arterial-venous O<sub>2</sub> content difference ratio in experimental circulatory shock and hypoxia. *Intensive*

- Care Med Exp 8: 64.  
<https://doi.org/10.1186/s40635-020-00353-9>
54. Yeo J, Yun J, Son DJ, Han S-B, Hong JT (2020) Antifungal drug miconazole ameliorated memory deficits in a mouse model of LPS-induced memory loss through targeting iNOS. *Cell Death Dis* 11: 623.  
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2619-5>
  55. Wang L, Cao Y, Gorshkov B, Zhou Y, Yang Q, Xu J, Ma Q, Zhang X, Wang J, Mao X, Zeng X, Su Y, Verin AD, Hong M, Liu Z, Huo Y (2019) Ablation of endothelial Pfkfb3 protects mice from acute lung injury in LPS-induced endotoxemia. *Pharmacol Res* 146: 104292.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104292>
  56. Jadhav K, Cohen TS (2020) Can You Trust Your Gut? Implicating a Disrupted Intestinal Microbiome in the Progression of NAFLD/NASH. *Front Endocrinol* 11: 592157.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.592157>
  57. Solé C, Guilly S, Da Silva K, Llopis M, Le-Chatelier E, Huelin P, Carol M, Moreira R, Fabrellas N, De Prada G, Napoleone L, Graupera I, Pose E, Juanola A, Borrueal N, Berland M, Toapanta D, Casellas F, Guarner F, Doré J, Solà E, Ehrlich SD, Ginès P (2021) Alterations in Gut Microbiome in Cirrhosis as Assessed by Quantitative Metagenomics: Relationship With Acute-on-Chronic Liver Failure and Prognosis. *Gastroenterology* 160: 206–218.e13.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.08.054>
  58. Nežić L, Škrbić R, Amidžić L, Gajanin R, Milovanović Z, Nepovimova E, Kuća K, Jačević V (2020) Protective Effects of Simvastatin on Endotoxin-Induced Acute Kidney Injury through Activation of Tubular Epithelial Cells' Survival and Hindering Cytochrome C-Mediated Apoptosis. *Int J Mol Sci* 21: E7236.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21197236>
  59. Soria LR, Marrone J, Molinas SM, Lehmann GL, Calamita G, Marinelli RA (2014) Lipopolysaccharide impairs hepatocyte ureagenesis from ammonia: Involvement of mitochondrial aquaporin-8. *FEBS Lett* 588: 1686–1691.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.012>
  60. Skowrońska M, Zielińska M, Wójcik-Stanaszek L, Ruszkiewicz J, Milatovic D, Aschner M, Albrecht J (2012) Ammonia increases paracellular permeability of rat brain endothelial cells by a mechanism encompassing oxidative/nitrosative stress and activation of matrix metalloproteinases: Ammonia-induced brain endothelium damage. *J Neurochem* 121: 125–134.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07669.x>
  61. Zijlstra FJ, van Meeteren ME, Garrelts IM, Meijssen MAC (2003) Effect of pharmacologically induced smooth muscle activation on permeability in murine colitis. *Mediators Inflamm* 12: 21–27.  
<https://doi.org/10.1080/0962935031000096944>
  62. Wilms E, Jonkers DMAE, Savelkoul HFJ, Elizalde M, Tischmann L, de Vos P, Masclee AAM, Troost FJ (2019) The Impact of Pectin Supplementation on Intestinal Barrier Function in Healthy Young Adults and Healthy Elderly. *Nutrients* 11: 1554.  
<https://doi.org/10.3390/nu11071554>
  63. Шефер ТВ, Рейнюк ВЛ, Краснов КА, Ивницкий ЮЮ (2011) Повышение циклофосфаном проницаемости тонкой кишки крыс для содержащихся в ее просвете гидрофильных веществ средней молярной массы. *Medline.ru. Рос биомед журн* 12: 1437–1449. [*Schäfer TV, Rejniuk VL, Krasnov KA, Ivnitsky JuJu* (2011) Increased permeability of a small intestine to luminal hydrophylic medium-sized molecules in cyclophosphamide-treated rats. *Medline.ru. Russ Biomed J* 12: 1437–1449. (In Russ)].
  64. Jiang Y, Bian Y, Lian N, Wang Y, Xie K, Qin C, Yu Y (2020) iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of Intestines in Murine Polymicrobial Sepsis with Hydrogen Gas Treatment. *Drug Des Devel Ther* 14: 4885–4900.  
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S271191>
  65. Di Palo DM, Garruti G, Di Ciaula A, Molina-Molina E, Shanmugam H, De Angelis M, Portincasa P (2020) Increased Colonic Permeability and Lifestyles as Contributing Factors to Obesity and Liver Steatosis. *Nutrients* 12: E564.  
<https://doi.org/10.3390/nu12020564>
  66. Wick MJ, Harral JW, Loomis ZL, Dempsey EC (2018) An Optimized Evans Blue Protocol to Assess Vascular Leak in the Mouse. *J Vis Exp* 57037.  
<https://doi.org/10.3791/57037>
  67. Alves NG, Motawe ZY, Yuan SY, Breslin JW (2018) Endothelial Protrusions in Junctional Integrity and Barrier Function. *Curr Top Membr* 82: 93–140.  
<https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2018.08.006>
  68. Ijiri K, Potten CS (1983) Response of intestinal cells of differing topographical and hierarchical status to ten cytotoxic drugs and five sources of radiation. *Br J Cancer* 47: 175–185.  
<https://doi.org/10.1038/bjc.1983.25>

69. Куценко СА (2004) Основы токсикологии. СПб. Фолиант. [Kutsenko SA (2004) Fundamentals of Toxicology. Saint-Petersburg. Foliant Publ House. (In Russ)].
70. Bishehsari F, Magno E, Swanson G, Desai V, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A (2017) Alcohol and Gut-Derived Inflammation. *Alcohol Res Curr Rev* 38: 163–171.
71. Zhao Y, Zhou C, Wu C, Guo X, Hu G, Wu Q, Xu Z, Li G, Cao H, Li L, Latigo V, Liu P, Cheng S, Liu P (2020) Subchronic oral mercury caused intestinal injury and changed gut microbiota in mice. *Sci Total Environ* 721: 137639. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137639>
72. Akbarali HI, Dewey WL (2017) The gut-brain interaction in opioid tolerance. *Curr Opin Pharmacol* 37: 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.10.012>
73. Puel O, Galtier P, Oswald I (2010) Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* 2: 613–631. <https://doi.org/10.3390/toxins2040613>
74. Karádi O, Nagy Z, Bódis B, Mózsik G (2001) Atropine-induced gastrointestinal cytoprotection dependences to the intact of vagal nerve against indomethacin-induced gastrointestinal mucosal and microvascular damage in rats. *J Physiol (Paris)* 95: 29–33. [https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(01\)00006-7](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(01)00006-7)
75. Ishisono K, Mano T, Yabe T, Kitaguchi K (2019) Dietary Fiber Pectin Ameliorates Experimental Colitis in a Neutral Sugar Side Chain-Dependent Manner. *Front Immunol* 10: 2979. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02979>
76. Ge L, Lin Z, Le G, Hou L, Mao X, Liu S, Liu D, Gan F, Huang K (2020) Nontoxic-dose deoxyvalenol aggravates lipopolysaccharides-induced inflammation and tight junction disorder in IPEC-J2 cells through activation of NF- $\kappa$ B and LC3B. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 145: 111712. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111712>
77. Семенов ЭИ, Мишина НН, Папуниди КХ (2019) Неучтенная анафилактическая реакция на действие микотоксинов. *Medline.ru. Рос биомед журн* 20: 36–43. [Semenov EI, Mishina NN, Papunidi KH (2019) Unaccounted anaphylactic reaction to effect of mycotoxins. *Medline.ru. Russ Biomed J* 20: 36–43. (In Russ)].
78. McMillen KK, Coghlin-Dickson T, Adintori PA (2021) Optimization of nutrition support practices early after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 56: 314–326. <https://doi.org/10.1038/s41409-020-01078-9>
79. Ivnitsky JuJu, Schäfer TV, Tyaptin AA, Rejniuk VL (2019) Changes in the chemical composition of blood and brain of rats under the conditions of modeling of the myeloablation regimen of cyclophosphamide administration. *Toxicol Rev* 13–18. <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2019-3-13-18>
80. Ivnitsky JuJu, Schäfer TV, Rejniuk VL (2011) Promotion of the Toxic Action of Cyclophosphamide by Digestive Tract Luminal Ammonia in Rats. *ISRN Toxicol* 2011: 1–4. <https://doi.org/10.5402/2011/450875>
81. Rejniuk VL, Schäfer TV, Ivnitsky JuJu (2010) Increase of Ammonia Pool in the Gastrointestinal Tract of Rats Potentiates Acute Toxicity of Cyclophosphamide. *Bull Exp Biol Med* 149: 718–720. <https://doi.org/10.1007/s10517-010-1034-9>
82. Khyzhnyak SV, Bezdrobna LK, Stepanova LI, Morozova VS, Voitsitskiy VM (2014) Oxidative phosphorylation in mitochondria of small-intestinal enterocytes at chronic and single exposure to low power ionizing radiation. *Probl Rad Med Radiobiol* 19: 482–489.
83. Khanna K, Mishra KP, Chanda S, Eslavath MR, Ganju L, Kumar B, Singh SB (2019) Effects of Acute Exposure to Hypobaric Hypoxia on Mucosal Barrier Injury and the Gastrointestinal Immune Axis in Rats. *High Alt Med Biol* 20: 35–44. <https://doi.org/10.1089/ham.2018.0031>
84. Hill GW, Gillum TL, Lee BJ, Romano PA, Schall ZJ, Hamilton AM, Kuennen MR (2020) Prolonged treadmill running in normobaric hypoxia causes gastrointestinal barrier permeability and elevates circulating levels of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab* 45: 376–386. <https://doi.org/10.1139/apnm-2019-0378>
85. Abuga KM, Muriuki JM, Williams TN, Atkinson SH (2020) How Severe Anaemia Might Influence the Risk of Invasive Bacterial Infections in African Children. *Int J Mol Sci* 21: E6976. <https://doi.org/10.3390/ijms21186976>
86. Khazoom F, L'Écuyer S, Gilbert K, Gagné M-A, Bouchard C, Rose CF, Rousseau G, Charbonney E (2020) Impact of uric acid on liver injury and intestinal permeability following resuscitated hemorrhagic shock in rats. *J Trauma Acute Care Surg* 89: 1076–1084. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000002868>

87. *Saxena A, Lopes F, McKay DM* (2018) Reduced intestinal epithelial mitochondrial function enhances in vitro interleukin-8 production in response to commensal *Escherichia coli*. *Inflamm Res* 67: 829–837.  
<https://doi.org/10.1007/s00011-018-1172-5>
88. *Bär F, Bochmann W, Widok A, von Medem K, Pagel R, Hirose M, Yu X, Kalies K, König P, Böhm R, Herdegen T, Reinicke AT, Büning J, Lehnert H, Fellermann K, Ibrahim S, Sina C* (2013) Mitochondrial gene polymorphisms that protect mice from colitis. *Gastroenterology* 145: 1055–1063.e3.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.015>
89. *Звенигородская ЛА, Самсонова НГ, Топорков АС* (2010) Хроническая ишемическая болезнь органов пищеварения: алгоритм диагностики и лечения. *Рус мед журн* 9: 544–548. [*Zvenigorodskaya LA, Samsonova NG, Toporkov AS* (2010) Chronic ischemic disease of the digestive system: an algorithm for diagnosis and treatment. *Russ Med Zhurn* 9: 544–548. (In Russ)].
90. *Uno Y* (2019) Hypothesis: Mechanism of irritable bowel syndrome in inflammatory bowel disease. *Med Hypotheses* 132: 109324.  
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.109324>
91. *Lychkova AE* (2005) Gradients of serotonergic innervation of the large intestine. *Bull Exp Biol Med* 139: 550–553.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-005-0342-y>
92. *Deane AM, Chapman MJ, Reintam Blaser A, McClave SA, Emmanuel A* (2019) Pathophysiology and Treatment of Gastrointestinal Motility Disorders in the Acutely Ill. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr* 34: 23–36.  
<https://doi.org/10.1002/ncp.10199>
93. *Ivnitsky JuJu, Rejniuk VL, Schäfer TV, Malakhovsky VN* (2006) Fulminant hyperammonaemia induced by thiopental coma in rats. *Toxicology* 224: 184–190.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.002>
94. *Schäfer TV, Ivnitsky JuJu, Rejniuk VL* (2022) Modelling myeloablative cytostatic therapy with cyclophosphamide is accompanied by gastrointestinal stasis in rats. *Med Extrem Situat* 1: 51–55.  
<https://doi.org/10.47183/mes.2022.001>
95. *Visek WJ* (1972) Effects of urea hydrolysis on cell life-span and metabolism. *Fed Proc* 31: 1178–1193.
96. *Zhao J, He Y, Xu P, Liu J, Ye S, Cao Y* (2020) Serum ammonia levels on admission for predicting sepsis patient mortality at D28 in the emergency department: A 2-center retrospective study. *Medicine (Baltimore)* 99: e19477.  
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019477>
97. *Horioka K, Tanaka H, Iozaki S, Konishi H, Fujiya M, Okuda K, Asari M, Shiono H, Ogawa K, Shimizu K* (2020) Acute Colchicine Poisoning Causes Endotoxemia via the Destruction of Intestinal Barrier Function: The Curative Effect of Endotoxin Prevention in a Murine Model. *Dig Dis Sci* 65: 132–140.  
<https://doi.org/10.1007/s10620-019-05729-w>
98. *Lee SI, Kang KS* (2017) Function of capric acid in cyclophosphamide-induced intestinal inflammation, oxidative stress, and barrier function in pigs. *Sci Rep* 7: 16530.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16561-5>
99. *Herbers AHE, de Haan AFJ, van der Velden WJFM, Donnelly JP, Blijlevens NMA* (2014) Mucositis not neutropenia determines bacteremia among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* 16: 279–285.  
<https://doi.org/10.1111/tid.12195>
100. *Mathieson PW, Thiru S, Oliveira DB* (1992) Mercuric chloride-treated brown Norway rats develop widespread tissue injury including necrotizing vasculitis. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 67: 121–129.
101. *Winnard KP, Dmitrieva N, Berkley KJ* (2006) Cross-organ interactions between reproductive, gastrointestinal, and urinary tracts: modulation by estrous stage and involvement of the hypogastric nerve. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 291: R1592–R1601.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00455.2006>
102. *Matkevich VA, Luzhnikov EA, Belova MV, Yevdokimova NV, Syromyatnikova ED, Kurilkin YA* (2015) The role of intestinal translocation in the origin of endotoxemia in acute poisoning and detoxification effect of intestinal lavage. *Russ Sklifosovsky J Emerg Med Care* 16–21.
103. *Matkevich VA, Potkhveriya MM, Goldfarb YuS, Simonova AYU* (2018) Violations of homeostasis parameters in acute poisonings and ways of their correction. *Toxicol Rev* 18–26.  
<https://doi.org/10.36946/0869-7922-2018-3-18-26>
104. *Aburto-Fernández MDC, Araujo-López A, García-Godoy IU, Alvarado-González A, Gutiérrez-Samperio JL, de Orendáin AA-M, Ocio MAR, Arteaga-Villalba LR, Herrera-Díaz A, Jiménez-Ríos CO,*

- Lerma-Alvarado RM* (2019) Secondary colonic necrosis. Case report. *Cir Cir* 87: 33–37.  
<https://doi.org/10.24875/CIRU.18000656>
105. *Chaung WW, Brenner M, Yen H-T, Ochani ML, Jacob A, Wang P* (2019) Recombinant human milk fat globule-EGF factor VIII (rhMFG-E8) as a therapy for sepsis after acute exposure to alcohol. *Mol Med Camb Mass* 25: 52.  
<https://doi.org/10.1186/s10020-019-0118-x>
106. *Johansson J-E, Hasséus B, Johansson P, Eklöf C, Ohman D, Stockelberg D* (2009) Gut protection by palifermin during autologous haematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 43: 807–811.  
<https://doi.org/10.1038/bmt.2008.388>
107. *Guinan EC, Palmer CD, Mancuso CJ, Brennan L, Stoler-Barak L, Kalish LA, Suter EE, Gallington LC, Huhnelin DP, Mansilla M, Schumann RR, Murray JC, Weiss J, Levy O* (2014) Identification of single nucleotide polymorphisms in hematopoietic cell transplant patients affecting early recognition of, and response to, endotoxin. *Innate Immun* 20: 697–711.  
<https://doi.org/10.1177/1753425913505122>
108. *Laemmle A, Hahn D, Hu L, Rüfenacht V, Gautschi M, Leibundgut K, Nuoffer J-M, Häberle J* (2015) Fatal hyperammonemia and carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency following high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Mol Genet Metab* 114: 438–444.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.01.002>
109. *Uygun V, Karasu G, Daloğlu H, Hazar V, Yeşilipek A* (2015) Idiopathic hyperammonemia after hematopoietic stem cell transplantation: A case report. *Pediatr Transplant* 19: E104–E105.  
<https://doi.org/10.1111/petr.12467>
110. *Webster LT* (1965) Hepatic coma – a biochemical disorder of the brain. *Gastroenterology* 49: 698–702.
111. *Kimura A, Yoshida I, Ono E, Matsuishi T, Yoshino M, Yamashita F, Yamamoto M, Hashimoto T, Shinka T, Kuhara T* (1986) Acute encephalopathy with hyperammonemia and dicarboxylic aciduria during calcium hopantenate therapy: a patient report. *Brain Dev* 8: 601–605.  
[https://doi.org/10.1016/s0387-7604\(86\)80006-7](https://doi.org/10.1016/s0387-7604(86)80006-7)
112. *Slyundin DG, Alekhovich AV, Ivanov VB, Livanov AS, Anuchin VV* (2010) The pharmacological correction of hyperammonemias conditions at the criminal poisoning clozapine. *Medline.ru. Russ Biomed J* 11: 518–525.
113. *Kramer L, Bauer E, Schenk P, Steininger R, Vigl M, Mallek R* (2003) Successful treatment of refractory cerebral oedema in ecstasy/cocaine-induced fulminant hepatic failure using a new high-efficacy liver detoxification device (FPSA-Prometheus). *Wien Klin Wochenschr* 115: 599–603.  
<https://doi.org/10.1007/BF03040456>
114. *Goldberg JE, Hamilton WK* (1959) Blood ammonia levels during ether and cyclopropane anesthesia. *Anesthesiology* 20: 836–841.  
<https://doi.org/10.1097/00000542-195911000-00015>
115. *Yamamoto H* (1993) Relationship among cyanide-induced encephalopathy, blood ammonia levels, and brain aromatic amino acid levels in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 50: 274–281.  
<https://doi.org/10.1007/BF00191733>
116. *Ивницкий ЮЮ, Шефер ТВ, Рейнюк ВЛ* (2010) Перераспределение аммиака между пищеварительным трактом и кровью при моделировании алкогольной комы: роль в формировании летального исхода. *Патол физиол экспер терапия* 3:34–37. [*Ivnitsky JuJu, Schäfer TV, Rejniuk VL* (2010) Redistribution of gastrointestinal ammonia into blood in alcohol coma rat: the role in lethal outcome. *Patol fiziol eksperim terapiya* 3: 34–37. (In Russ)].
117. *Watanabe A, Kuwabara Y* (1994) Hyperammonemia induced in rats by inhalation anesthesia with ether. *Res Exp Med (Berl)* 194: 157–164.  
<https://doi.org/10.1007/BF02576376>
118. *Proudfoot AT, Bradberry SM, Vale JA* (2006) Sodium fluoroacetate poisoning. *Toxicol Rev* 25: 213–219.  
<https://doi.org/10.2165/00139709-200625040-00002>
119. *Mitani S, Kadowaki S, Komori A, Sugiyama K, Narita Y, Taniguchi H, Ura T, Ando M, Sato Y, Yamaura H, Inaba Y, Ishihara M, Tanaka T, Tajika M, Muro K* (2017) Acute hyperammonemic encephalopathy after fluoropyrimidine-based chemotherapy: A case series and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 96: e6874.  
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006874>
120. *Blennow G, Folbergrova J, Nilsson B, Siesjö BK* (1979) Cerebral metabolic and circulatory changes in the rat during sustained seizures induced by DL-homocysteine. *Brain Res* 179: 129–146.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90497-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90497-9)
121. *Maslinski PG, Loeb JA* (2004) Pica-associated cerebral edema in an adult. *J Neurol Sci* 225: 149–151.  
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.07.016>

122. Foster WA, Schoenhals JA (1995) Hyperammonemia with severe methanol intoxication. *West J Med* 163: 377–379.
123. Singh AK, Banister EW (1983) Tissue ammonia and amino acids in rats at various oxygen pressures. *J Appl Physiol* 54: 438–444.  
<https://doi.org/10.1152/jappl.1983.54.2.438>
124. Simma B, Meister B, Deutsch J, Sperl W, Fend F, Öfner D, Margreiter R, Vogel W (1995) Fulminant hepatic failure in a child as a potential adverse effect of trimethoprim-sulphamethoxazole. *Eur J Pediatr* 154: 530–533.  
<https://doi.org/10.1007/BF02074828>
125. Woo PYM, Woo AWY, Lam SW, Ko NMW, Ho JWK, Chu ACH, Kwan MCL, Chan Y, Wong H-T, Chan K-Y (2020) Incidence, Presentation, and Risk Factors for Sodium Valproate-Associated Hyperammonemia in Neurosurgical Patients: A Prospective, Observational Study. *World Neurosurg* 144: e597–e604.  
<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.09.027>
126. Козлов НБ (1971) Аммиак, его обмен и роль в патологии. М. Медицина. [Kozlov NB (1971) Ammonia, its exchange and role in pathology. Moscow. Medicina. (In Russ)].
127. Gao C, Wang D, Li W, Guo X, Ma J, Xie Y (2020) [Value of blood ammonia on predicting the severity and prognosis of patients with sepsis: a prospective observation study]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 32: 1315–1319.  
<https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121430-20200305-00210>
128. Singla A, Kaur S, Kaur N, Gill C (2016) Arterial ammonia levels: Prognostic marker in traumatic hemorrhage. *Int J Appl Basic Med Res* 6: 255.  
<https://doi.org/10.4103/2229-516X.192601>
129. Hagiwara A, Sakamoto T (2009) Clinical Significance of Plasma Ammonia in Patients With Traumatic Hemorrhage. *J Trauma Inj Infect Crit Care* 67: 115–120.  
<https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181a5e63e>
130. Lin C-H, Chi C-H, Wu S-Y, Hsu H-C, Chang Y-H, Huang Y-Y, Chang C-J, Hong M-Y, Chan T-Y, Shih H-I (2013) Prognostic values of blood ammonia and partial pressure of ammonia on hospital arrival in out-of-hospital cardiac arrests. *Am J Emerg Med* 31: 8–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2012.04.037>
131. Fujiwara Y, Ohnishi K, Horlad H, Saito Y, Shiraishi D, Takeya H, Yoshii D, Kaieda S, Hoshino T, Komohara Y (2020) CD163 deficiency facilitates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and endotoxin shock in mice. *Clin Transl Immunol* 9: e1162.  
<https://doi.org/10.1002/cti2.1162>
132. Luna M, Kamariski M, Principi I, Bocanegra V, Vallés PG (2021) Severely ill pediatric patients with Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome (STEC-HUS) who suffered from multiple organ involvement in the early stage. *Pediatr Nephrol* 36: 1499–1509.  
<https://doi.org/10.1007/s00467-020-04829-4>
133. Hu C, Sun J, Du J, Wen D, Lu H, Zhang H, Xue Y, Zhang A, Yang C, Zeng L, Jiang J (2019) The Hippo-YAP pathway regulates the proliferation of alveolar epithelial progenitors after acute lung injury. *Cell Biol Int* 43: 1174–1183.  
<https://doi.org/10.1002/cbin.11098>
134. Thuijls G, Derikx JPM, Haan J-J de, Grootjans J, Bruïne A de, Masclee AAM, Heineman E, Buurman WA (2010) Urine-based Detection of Intestinal Tight Junction Loss. *J Clin Gastroenterol* 44: e14–e19.  
<https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31819f5652>
135. Храмых ТП, Долгих ВТ (2009) К вопросу об эндотоксемии при геморрагической гипотензии. Патол физиол эксперим терапия 1: 28–29. [Khramykh TP, Dolgikh VT (2009) Endotoxemia in hemorrhagic hypotension. *Patol fiziol eksperim terapiya* 1: 28–30. (In Russ)].
136. Kumar M, Kaeley N, Nagasubramanyam V, Bhardwaj BB, Kumar S, Kabi A, Arora P, Dhar M (2019) Single center experience of managing methanol poisoning in the hilly state of Uttarakhand: A cross sectional study. *Int J Crit Illn Inj Sci* 9: 172–176.  
[https://doi.org/10.4103/IJCIIS.IJCIIS\\_49\\_19](https://doi.org/10.4103/IJCIIS.IJCIIS_49_19)
137. Chew CH, Cheng L-W, Huang W-T, Wu YM, Lee C-W, Wu M-S, Chen C-C (2020) Ultrahigh packing density next generation microtube array membrane: A novel solution for absorption-based extracorporeal endotoxin removal device. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 108: 2903–2911.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.34621>
138. Novosad SA, Sapiano MRP, Grigg C, Lake J, Robyn M, Dumyati G, Felsen C, Blog D, Dufort E, Zansky S, Wiedeman K, Avery L, Dantes RB, Jernigan JA, Magill SS, Fiore A, Epstein L (2016) Vital Signs: Epidemiology of Sepsis: Prevalence of Health Care Factors and Opportunities for Prevention. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65: 864–869.  
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6533e1>

139. Śmiechowicz J (2022) The Rationale and Current Status of Endotoxin Adsorption in the Treatment of Septic Shock. *J Clin Med* 11: 619.  
<https://doi.org/10.3390/jcm11030619>
140. Chen S, Xiu G, Zhou J, Liu P, Chen X, Sun J, Ling B (2020) [Role of high mobility group box 1 in intestinal mucosal barrier injury in rat with sepsis induced by endotoxin]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 32: 803–807.  
<https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121430-20200109-00126>
141. Colbert JF, Schmidt EP (2016) Endothelial and Microcirculatory Function and Dysfunction in Sepsis. *Clin Chest Med* 37: 263–275.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.01.009>
142. Soltanian A, Mosallanejad B, Razi Jalali M, Najafzadeh Varzi H, Ghorbanpoor M (2020) Comparative evaluation of the therapeutic effects of silymarin and hydrocortisone on clinical and hematological alterations, and organ injury (liver and heart) in low-dose canine lipopolysaccharide-induced sepsis model. *Vet Res Forum* 11: 235–241.  
<https://doi.org/10.30466/vrf.2018.83961.2105>
143. Pool R, Gomez H, Kellum JA (2018) Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. *Crit Care Clin* 34: 63–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccc.2017.08.003>
144. Maniatis NA, Kotanidou A, Catravas JD, Orfanos SE (2008) Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. *Vascu Pharmacol* 49: 119–133.  
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.06.009>
145. Wang W, Weng J, Yu L, Huang Q, Jiang Y, Guo X (2018) Role of TLR4-p38 MAPK-Hsp27 signal pathway in LPS-induced pulmonary epithelial hyperpermeability. *BMC Pulm Med* 18: 178.  
<https://doi.org/10.1186/s12890-018-0735-0>
146. Forrester SJ, Xu Q, Kikuchi DS, Okwan-Duodu D, Campos AC, Faidley EA, Zhang G, Lassègue B, Sadikot RT, Griending KK, Hernandez MS (2019) Poldip2 deficiency protects against lung edema and vascular inflammation in a model of acute respiratory distress syndrome. *Clin Sci Lond Engl* 133: 321–334.  
<https://doi.org/10.1042/CS20180944>
147. Al-Ani B, ShamsEldeen AM, Kamar SS, Haidara MA, Al-Hashem F, Alshahrani MY, Al-Hakami AM, Kader DHA, Maarouf A (2022) Lipopolysaccharide induces acute lung injury and alveolar haemorrhage in association with the cytokine storm, coagulopathy and AT1R/JAK/STAT augmentation in a rat model that mimics moderate and severe Covid-19 pathology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 49: 483–491.  
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.13620>
148. Bloom PP, Rodriguez-Lopez J, Witkin AS, Al-Samkari H, Kuter DJ, Mojtahed A, Luther J (2020) Ammonia Predicts Hepatic Involvement and Pulmonary Hypertension in Patients With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Clin Transl Gastroenterol* 11: e00118.  
<https://doi.org/10.14309/ctg.000000000000118>
149. Liang X-Y, Jia T-X, Zhang M (2021) Intestinal bacterial overgrowth in the early stage of severe acute pancreatitis is associated with acute respiratory distress syndrome. *World J Gastroenterol* 27: 1643–1654.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i15.1643>
150. Шилов ВВ, Александров МВ, Васильев СА, Александрова ТВ, Черный ВС (2010) Острая церебральная недостаточность при тяжелых отравлениях. *Medline.ru. Рос биомед журн* 11: 315–321. [Shilov VV, Aleksandrov MV, Vasilev SA, Aleksandrova TV, Chernyi VS (2010) Acute cerebral failure at the serious poisoning. *Medline.ru. Russ Biomed J* 11(art. 25): 315–321. (In Russ)].
151. Sheikh MF, Unni N, Agarwal B (2018) Neurological Monitoring in Acute Liver Failure. *J Clin Exp Hepatol* 8: 441–447.  
<https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.04.013>
152. Pang R, Martinello KA, Meehan C, Avdic-Belltheus A, Lingam I, Sokolska M, Mutshiya T, Bainbridge A, Golay X, Robertson NJ (2020) Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Lactate/N-Acetylaspartate Within 48 h Predicts Cell Death Following Varied Neuroprotective Interventions in a Piglet Model of Hypoxia-Ischemia With and Without Inflammation-Sensitization. *Front Neurol* 11: 883.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00883>
153. Wood T, Moralejo D, Corry K, Fisher C, Snyder JM, Acuna V, Holden-Hunt A, Virk S, White O, Law J, Parikh P, Juul SE (2019) A Ferret Model of Inflammation-sensitized Late Preterm Hypoxic-ischemic Brain Injury. *J Vis Exp* (153): e60131.  
<https://doi.org/10.3791/60131>
154. Zhou Y, Huang X, Zhao T, Qiao M, Zhao X, Zhao M, Xu L, Zhao Y, Wu L, Wu K, Chen R, Fan M, Zhu L (2017) Hypoxia augments LPS-induced inflammation and triggers high altitude cere-

- bral edema in mice. *Brain Behav Immun* 64: 266–275.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.04.013>
155. Chicherin IYu, Pogorelsky IP, Lundovskikh IA, Gavrilov KE, Shabalina MR, Darmov IV (2013) Autoprobiotic therapy. *J Infectology* 5: 43–54.  
<https://doi.org/10.22625/2072-6732-2013-5-4-43-54>
  156. Shenderov BA (2011) Probiotics and Functional Foods. In: *Food Engineering*. Oxford. UK. EOLSS Publishers. p 36.
  157. Suvorov A (2013) Gut Microbiota, Probiotics, and Human Health. *Biosci Microbiota Food Health* 32: 81–91.  
<https://doi.org/10.12938/bmfh.32.81>
  158. Gromova LV, Ermolenko EI, Sepp AL, Dmitrieva YV, Alekseeva AS, Lavrenova NS, Kotyleva MP, Kramskaya TA, Karaseva AB, Suvorov AN, Gruzdkov AA (2021) Gut Digestive Function and Microbiome after Correction of Experimental Dysbiosis in Rats by Indigenous Bifidobacteria. *Microorganisms* 9: 522.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9030522>
  159. Шефер ТВ, Ивницкий ЮЮ, Рейнюк ВЛ (2015) Влияние сока подорожника на проявления и исход острой интоксикации циклофосфаном у крыс. *Биопрепараты* 3: 61–63. [Schäfer TV, Ivnitsky JuJu, Rejniuk VL (2015) The influence of the plantain juice on the manifestations and outcome of acute cyclophosphamide intoxication in rats. *Biopreparaty* 55(3): 61–64. (In Russ)].
  160. Sabando C, Ide W, Rodríguez-Díaz M, Cabrera-Barjas G, Castaño J, Bouza R, Müller N, Gutiérrez C, Barral L, Rojas J, Martínez F, Rodríguez-Llamazares S (2020) A Novel Hydrocolloid Film Based on Pectin, Starch and Gunnera tinctoria and Ugni molinae Plant Extracts for Wound Dressing Applications. *Curr Top Med Chem* 20: 280–292.  
<https://doi.org/10.2174/1568026620666200124100631>
  161. Çağan E, Ceylan S, Mengi Ş, Çağan HH (2017) Evaluation of Gelatin Tannate Against Symptoms of Acute Diarrhea in Pediatric Patients. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 23: 2029–2034.  
<https://doi.org/10.12659/msm.903158>
  162. Rinaldi B, Cuzzocrea S, Donniacuo M, Capuano A, Di Palma D, Imperatore F, Mazzon E, Di Paola R, Sodano L, Rossi F (2011) Hyperbaric oxygen therapy reduces the toll-like receptor signaling pathway in multiple organ failures. *Intensive Care Med* 37: 1110–1119.  
<https://doi.org/10.1007/s00134-011-2241-1>
  163. Alshami A, Einav S, Skrifvars MB, Varon J (2020) Administration of inhaled noble and other gases after cardiopulmonary resuscitation: A systematic review. *Am J Emerg Med* 38: 2179–2184.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.06.066>
  164. Assimakopoulos SF, Papadopoulou I, Bantouna D, de Lastic A-L, Rodi M, Mouzaki A, Gogos CA, Zolota V, Maroulis I (2021) Fecal Microbiota Transplantation and Hydrocortisone Ameliorate Intestinal Barrier Dysfunction and Improve Survival in a Rat Model of Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis. *Shock* August 55: 666–675.  
<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001566>

### Secondary Gut Barrier Dysfunction in the Pathogenesis of Complications of Acute Poisonings

Ju. Ju. Ivnitsky<sup>a</sup>, T. V. Schäfer<sup>b, \*</sup>, V. L. Rejniuk<sup>a</sup>, and O. A. Vakunenkov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russia

<sup>b</sup>State Scientific Research Test Institute of the Military Medicine of Defence Ministry of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

\*e-mail: [schafer@yandex.ru](mailto:schafer@yandex.ru)

The last decade has been marked by an exponential increase in the number of publications on the physiological role of the normal microbiota of the human gastrointestinal tract. The idea of a symbiotic relationship between a person and the normal microbiota of his gastrointestinal tract has established itself as an integral part of the current biomedical paradigm. However, the type of this symbiosis varies from mutualism to parasitism and depends on the functional state of the host organism. Damage to the latter by external agents can lead to the emergence of conditionally pathogenic properties in the normal intestinal microbiota, mediated by its humoral factors and affecting the outcome

of exogenous exposure. Among the substances produced by the symbiotic microbiota of the human gastrointestinal tract, there are an indefinite number of compounds with systemic toxicity. Some are found in the intestinal chyme in potentially lethal amounts if they enter the bloodstream quickly. Their rapid entry into the bloodstream is prevented by the intestinal barrier, a set of structures that separate the intestinal chyme from the blood. Hypothetically, acute damage to the intestinal barrier by exogenous toxicants can trigger leakage and subsequent systemic redistribution of toxic substances of bacterial origin. Meanwhile, the consequences of such redistribution in acute exogenous poisoning remain obscure. This selective review examines the causal relationship between secondary intestinal barrier dysfunction and complications of acute poisoning. Acute systemic toxicity of waste products of normal intestinal microflora, ammonia, and endotoxin, is characterized. Their involvement in shock, sepsis, acute secondary pulmonary lesions, and acute cerebral insufficiency, complicating acute poisonings, is specified. Principles of assessing the function of the intestinal barrier and approaches to its protection in acute poisonings are considered.

*Keywords:* acute exogenous poisoning, ammonia, complications, endotoxaemia, endotoxicosis, human gut microbiota, intestinal barrier

## ОРЕКСИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ СТРУКТУРЫ РЕТИКУЛЯРНОГО ЯДРА ТАЛАМУСА

© 2022 г. И. Ю. Морина<sup>1</sup>, И. В. Романова<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: irinaromanova@mail.ru

Поступила в редакцию 30.04.2022 г.

После доработки 18.05.2022 г.

Принята к публикации 28.05.2022 г.

У лабораторных млекопитающих (половозрелые крысы линии Вистар и Sprague-Dawley, мыши C57Bl/6J) в нейронах различных отделов ретикулярного ядра таламуса выявлены орексин-А и орексин-В, уровень иммунореактивности которых значительно ниже, чем в нейронах перифорникальной области гипоталамуса. У крыс Вистар в экспериментах с 6-часовой депривацией сна и 3-часовой иммобилизацией на спине выявлены разнонаправленные реакции орексин-иммунопозитивных нейронов в этих структурах мозга. Показано, что в ходе эмбрионального развития крыс Вистар в таламусе орексин-иммунопозитивные структуры идентифицируются уже на стадии E18, слабо развиты на стадии P14 и формируются к 30-му дню жизни, что совпадает с периодом становления цикла бодрствование–сон у крыс. Полученные данные свидетельствуют о том, что орексины ретикулярного ядра таламуса также вовлечены в регуляцию цикла бодрствование–сон.

*Ключевые слова:* орексины, ретикулярное ядро таламуса, гипоталамус, онтогенез, депривация сна, стресс

DOI: 10.31857/S0869813922070056

В 1998 г. две группы ученых, возглавляемых de Lecea и Sakurai, независимо друг от друга, открыли новое семейство нейропептидов – гипокретины или орексины [1, 2]. Название гипокретины было дано в связи с экспрессией мРНК в билатерально-симметричной структуре заднего гипоталамуса (“специфический гипоталамический транскрипт”) и с идентичностью в аминокислотной последовательности с гормоном секретинном. Второе название связано с участием в регуляции пищевого поведения и произошло от греческого слова orexis – аппетит [2]. К семейству орексинов относятся два нейропептида: орексин-А (или гипокретин-1) и орексин-В (или гипокретин-2), которые образуются в одном нейроне при протеолизе общего предшественника препро-орексина (препро-гипокретина). Действие орексинов осуществляется через два типа G-протеин-связанных рецепторов: рецептор первого типа, селективный только для орексина-А, и второго типа, через который осуществляют действие обоих орексинов [1, 2].

В мозге млекопитающих мРНК препро-орексина и образующиеся из него орексин-А и орексин-В описаны в нейронах перифорникальной области гипоталамуса, что, по-видимому, зависело от чувствительности метода выявления мРНК. Структуры с меньшим уровнем мРНК препро-орексина не идентифицировались,

поэтому функции орексинов в мозге связывают прежде всего с нейронами периферикальной области гипоталамуса, а другие популяции орексин-содержащих клеток мозга не рассматривались, что сужает представления о функциональной роли этих пептидов.

Известно, что орексины через взаимодействие с другими медиаторными системами принимают участие в регуляции двигательной активности [3] и работы нейроэндокринной оси, вовлечены в формирование мотивационного поведения и системы подкрепления, тревожности [4], принимают участие в регуляции стрессорного и иммунного ответа организма [5–7]. Но значительное внимание исследователей, с момента открытия и до сих пор, уделяется роли орексинов в регуляции пищевого поведения, энергетического баланса и цикла бодрствование–сон [1, 2, 4, 8]. В контроле цикла бодрствование–сон орексины являются звеном регуляции бодрствования и пробуждения, а дефицит орексинов и нарушение гена *Ox1r* приводит к развитию нарколепсии – патологии, характеризующейся приступами дневной сонливости и резким падением мышечного тонуса [9–12]. Стоит отметить, что в поддержании состояния бодрствования кроме орексинергических нейронов участвуют и ГАМК-нейроны латерального гипоталамуса, оказывающие ингибирующее влияние на ГАМК-нейроны ретикулярного ядра таламуса [13], которое относят к пейсмекерам веретен сна [14]. Эта структура занимает ключевое положение для таламокортикальных и кортикоталамических связей [15, 16], что определяет ее функциональное значение.

В 1896 г. Kölliker описал область ретикулярного ядра таламуса как белое вещество с пучками пересекающихся волокон [цит. по 16]. Позднее Munzer и Wiener дали ему название ретикулярное ядро таламуса [цит. по 16]. Показано, что это ядро представляет собой тонкую прослойку на границе дорзального таламуса с кортексом между внутренней капсулой и наружной медулярной пластинкой [16], которое в процессе эмбриогенеза образуется из вентрального таламуса и далее мигрирует дорсально, чтобы охватить главным образом переднюю и боковую части таламуса и частично его дорсальную и вентральную части. Функциональное ретикулярное ядро таламуса – ингибиторное ядро, гетерогенное по морфологическим и функциональным характеристикам. Признаками морфологической классификации являются форма сомы, характер ветвления дендритов и локализация в ядре. В ретикулярном ядре таламуса выделяют 3 типа клеток: R-клетки (круглая сома, сильно ветвистые дендриты, локализованные в передне-лимбическом секторе), F-клетки (большие веретеновидные, локализованные по всем ядру), f-клетки (маленькие веретеновидные, локализованные в сенсорных секторах) [17]. В ретикулярном ядре таламуса локализованы в основном ГАМКергические нейроны, которые равномерно распределены по всем секторам [18]. В то же время нейроны, экспрессирующие  $Ca^{2+}$ -связывающие протеины калретинин и калбиндин, локализованы неравномерно [19–21]. Также в ретикулярном ядре таламуса выявлены и такие пептиды, как тиреотропин-релизинг гормон, вазоактивный интестинальный пептид, пролактин-релизинг пептид [22–24]. Гетерогенность в функциональном плане основана на разделении ретикулярного ядра таламуса по меньшей мере на 7 секторов: 5 сенсорных (слуховой, вкусовой, соматосенсорный, висцеральный и зрительный), моторный и лимбический сектора. В зависимости от функционального значения в ретикулярном ядре таламуса выделяют три части: заднюю, среднюю и переднюю. Задняя часть участвует в модуляции зрительной [25], слуховой [26] и соматосенсорной информации [27], проекции из этой части идут в слуховую кору головного мозга. В среднюю часть приходят проекции от вкусовых и висцеральных структур, которые далее идут в сомато-сенсорную кору [27–29]. Проекции из моторных и лимбических структур, вовлеченных в визуальное движение и внимание, поступают в переднюю часть, а далее идут в префронтальную кору [29–31].

Следует отметить, что гипоталамическая локализация орексинергических нейронов прослеживается на всех этапах филогенеза позвоночных. Однако мРНК препро-орексина в таламической области показана у хрящевых рыб [32], а у человека в субталамическом ядре [2]. На основе этих данных, а также учитывая функциональную взаимосвязь латерального гипоталамуса и ретикулярного ядра таламуса, целью настоящего исследования было оценить локализацию орексин-иммунопозитивных структур в таламусе, в частности в ретикулярном ядре таламуса у разных линий крыс и мыши, а также оценить их развитие в ходе онтогенеза на примере крыс.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены согласно дизайну исследования, одобренному Этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, European Communities Council Directive 1986 (2010/63/ЕЕС), согласно правилам, изложенным в “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Эксперименты начинали в утренние часы (10–11 ч). Перед декапитацией животных наркотизировали внутривенно хлоралгидратом (400 мг/кг).

Для исследования были использованы: крысы неинбридной линии Вистар (18-дневные эмбрионы, 14- и 30-дневные крысята, половозрелые самцы и самки), содержащиеся в условиях вивария Института; половозрелые самцы крыс линии Sprague-Dawley (220–250 г) были привезены из питомника Пушино Московской области; самцы мыши С57Bl/6J (20–22 г) привезены из питомника Рапполово Ленинградской области и адаптированы к условиям вивария Института. Животных содержали в стандартных условиях вивария (12-часовой световой режим: 12 ч свет/12 ч ночь, световой день начинался в 9.00, температура  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) без ограничения доступа к воде и пище.

*Эксперимент с депривацией сна* был проведен согласно протоколу, подробно описанному ранее [33]. В эксперименте использовали 3 группы самцов крыс Вистар массой 220–250 г. Мозг контрольных животных (Контроль,  $n = 6$ ) забирали в период активного бодрствования в 10–11 ч. Экспериментальных животных с 10 до 15 ч лишали сна посредством мягкого прикосновения к вибриссам, не давая дремать и застывать. Через 6 ч депривации сна часть животных декапитировали (ДС,  $n = 6$ ), а остальных крыс декапитировали через 2 ч после прекращения депривации сна на фоне постдепривационного периода (ПДП,  $n = 6$ ).

*Эксперимент с иммобилизационным стрессом* проводили на самцах крыс Вистар массой 220–250 г. Контролем являлись интактные крысы (Контроль,  $n = 6$ ), которых декапитировали с 10 до 11 ч. Экспериментальные крысы – группы (Imm,  $n = 6$ ) были подвергнуты жесткой иммобилизации на спине, путем фиксации конечностей в течение 3 ч.

У самок крыс Вистар, отсаженных в отдельные клетки, брали мазки из влагалища для отслеживания фаз эстрального цикла, как описано ранее [8]. При наступлении фазы проэструса подсаживали самца, обнаружение сперматозоидов в мазке из влагалища считали первым днем беременности.

На 18-й день беременности двух самок наркотизировали, декапитировали и у эмбрионов (E18,  $n = 5$ ) фиксировали мозг с черепом [34]. Потомство оставшихся самок декапитировали на 14-й (P14,  $n = 5$ ) и 30-й (P30,  $n = 5$ ) дни жизни.

У всех животных после декапитации мозг фиксировали погружением в раствор 4%-ного параформальдегида (рН 7.4), растворенного в 0.2 М РВ, при  $4^\circ\text{C}$ , промывали в нескольких порциях холодного 0.02 М фосфатно-солевого буфера (PBS), помещали в 30%-ный раствор сахарозы, растворенной на PBS, при  $4^\circ\text{C}$  до погружения на дно посуды, после чего мозг замораживали с помощью изопентана (Sigma,

США), охлажденном до  $-42^{\circ}\text{C}$  и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . С помощью криостата (Leica, Германия) были изготовлены чередующиеся серии фронтальных срезов мозга (толщина 20 мкм), которые монтировали на стекла Super Frost/plus (Menzel, Германия). Для анализа выбирали стекла со срезами, содержащими перифорникальную область гипоталамуса и таламическое ядро согласно атласами мозга крысы или мыши [35, 36]. У эмбрионов верификацию областей мозга проводили согласно данным Coggeshall [37].

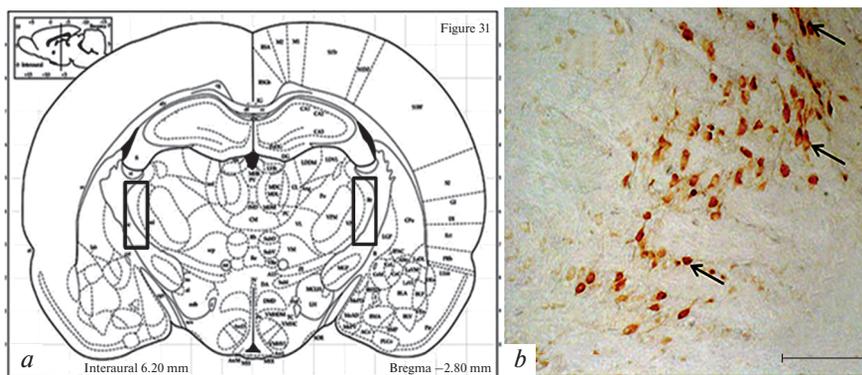
Иммуногистохимические реакции проводили после демаскировки антигена кипячением стекол со срезами в цитратном буфере (pH 6.0) согласно протоколу, который подробно был описан ранее [8]. Для реакций были использованы первичные антитела кролика к орексину-А (Sigma, США) или кролика к орексину-В (Sigma, США) в разведении 1 : 1000. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 48 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ . После тщательной промывки срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с биотином (Ig овцы против кролика, VectorLabs., США) в разведении 1 : 600 на PBS. После промывки в PBS срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре в растворе стрептовидин-пероксидазы (BioLegend, США), разведенной на PBS в соотношении 1 : 700. Для визуализации реакции использовали 0.05%-ный раствор диаминобензидина (Sigma, США) на PBS с 0.03%-ной перекисью водорода. Реакцию контролировали с помощью бинокулярной лупы до появления фона и останавливали в дистиллированной воде. Стекла подвергали стандартной гистологической обработке, заключали в прозрачную среду Bio-Mount (Bio-Optica, Италия).

Для двойного иммуномечения стекла со срезами мозга крыс Вистар с областью ретикулярного ядра таламуса после кипячения в цитратном буфере (pH 6.0) промывали в PBS и PBS с 0.1% TRITON X-100 (PBST). После блокировки неспецифического связывания в течение 30 мин в 100 мМ глицине и в течение 1 ч в 8%-ном блокирующем растворе (2% сыворотки козы, 2% сыворотки лошади, 4% сыворотки цыпленка, разведенные на PBST) срезы инкубировали при комнатной температуре в течение ночи в смеси первичных антител мыши к орексину-А (R&Dsystems, США; 1 : 1000) и кролика к орексину-В (Sigma, США; 1 : 500). После тщательной промывки в трех порциях PBST срезы инкубировали 1 ч в смеси вторичных антител (Ig овцы против мыши и цыпленка против кролика), конъюгированных с Alexa-568 и Alexa-488 (Invitrogen, США, в разведении 1 : 1000). После промывки в PBS срезы заключали под покровное стекло в среду Mowiol (Sigma, США) и хранили при  $4^{\circ}\text{C}$  до полимеризации.

Специфичность реакций проверяли негативным контролем (реакции без первичных антител).

Изображения изучаемых структур мозга с одиночным иммуномечением были получены в проходящем свете на микроскопе Carl Zeiss Imager A1 (Германия) со встроенной видеокамерой AxioCam 712, с программным обеспечением для захвата изображения Zen 3.4 (blue edition).

На снимках проводили визуальную оценку, а также с помощью программы Image J (NIH, США) оценивали оптическую плотность иммунопозитивного вещества в орексин-иммунопозитивных клетках перифорникальной области и таламического ядра в условных единицах (у. е.). На микрофотографиях, полученных из трех областей ретикулярного ядра таламуса контрольных крыс Вистар ( $n = 5$ ), визуально оценивали форму и размер клеток, по границе расположения иммунопозитивного вещества измеряли два диаметра по большой и меньшей оси клетки, высчитывали их средние значения. Анализ препаратов, докрашенных гематоксилином, свидетельствует о том, что граница иммунопозитивного вещества в орексин-иммунопозитивных клетках плотно прилегает к мембране клеток. Это дает основание полагать, что наши измерения отражают размеры клеток.



**Рис. 1.** Область локализации ретикулярного ядра таламуса (черные прямоугольники) на фронтальном срезе мозга крысы (*a*, по [36]); *b* – орексин-А иммунопозитивные клетки из этой области у крысы Вистар. Стрелки указывают на тела иммунопозитивных клеток, масштаб: 100 мкм.

Анализ двойного флуоресцентного иммуномечения проводили с помощью микроскопа DM16000 и лазерной сканирующей конфокальной установки Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия). Было проведено последовательное сканирование с помощью иммерсионного объектива х63 и лазеров с длиной волны возбуждения 488 и 568 нм.

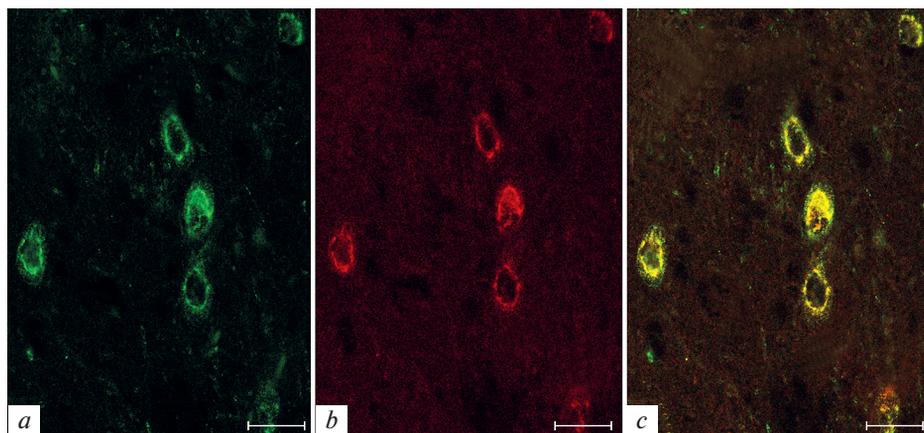
Статистический анализ данных проводили в программе STATISTICA.10, при уровне значимости  $p < 0.05$ . Оценку нормальности распределения данных проводили с использованием теста D'Agostino–Pearson. В случае отклонения от нормального распределения сравнение двух независимых групп проводилось с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для сравнения 3 независимых групп использовали H-критерий Крускала–Уоллиса и последующий апостериорный анализ межгрупповых различий по U-критерию Манна–Уитни с поправкой Холма–Бонферрони. Результаты анализа оптической плотности представлены как медиана (М) 50% данных с интерквартильными размахами. Диаметр клеток представлен как среднее  $\pm$  ошибка среднего (*mean*  $\pm$  *sem*).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

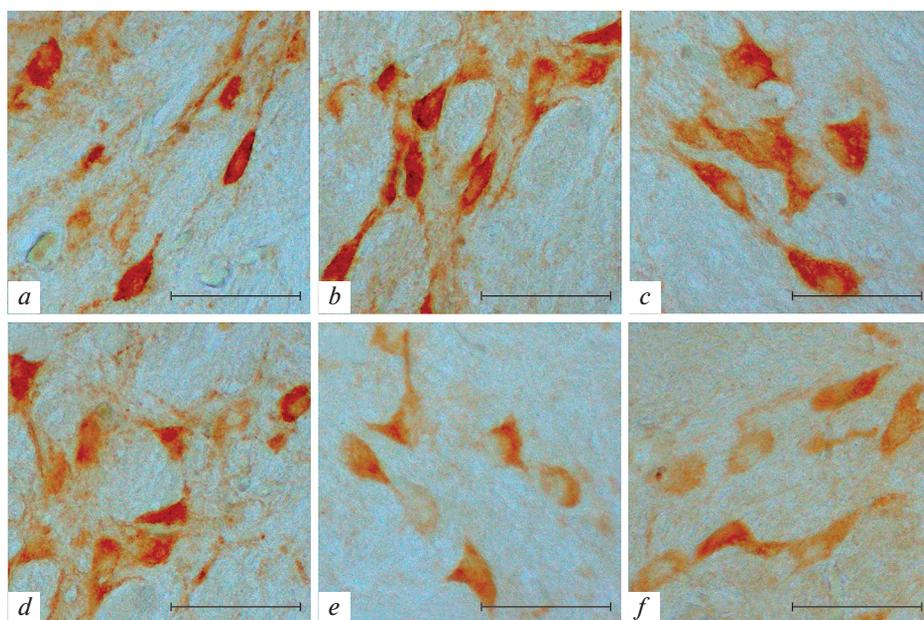
*Анализ препаратов мозга половозрелых животных* (крысы Вистар, крысы Sprague-Dawley, мыши C57Bl/6J) демонстрирует присутствие иммунопозитивных клеток к орексину-А и орексину-В как в перифорникальной области гипоталамуса, а также и в таламусе в области ретикулярного ядра.

У крыс Вистар орексин-иммунопозитивные клетки выявляются приблизительно на уровне от  $-1.88$  до  $-3.14$  мм от bregma [35] (рис. 1*a, b*). Результаты двойного флуоресцентного иммуномечения подтверждают локализацию орексинов-А и В в одной клетке (рис. 2).

В rostro-латеральной области ретикулярного ядра таламуса орексин-иммунопозитивные клетки в основном продолговатой формы (рис. 1*b, 2a–c*), в них отмечается центральное расположение ядра, расположение иммунопозитивного материала по периферии сомы и в отростках (рис. 3*a, b*). Диаметры орексин-А иммунопозитивных клеток в этой области варьируют  $11 \pm 0.3$  и  $6 \pm 0.2$  мкм,  $15.4 \pm 0.4$  и  $10.6 \pm 0.4$  мкм.

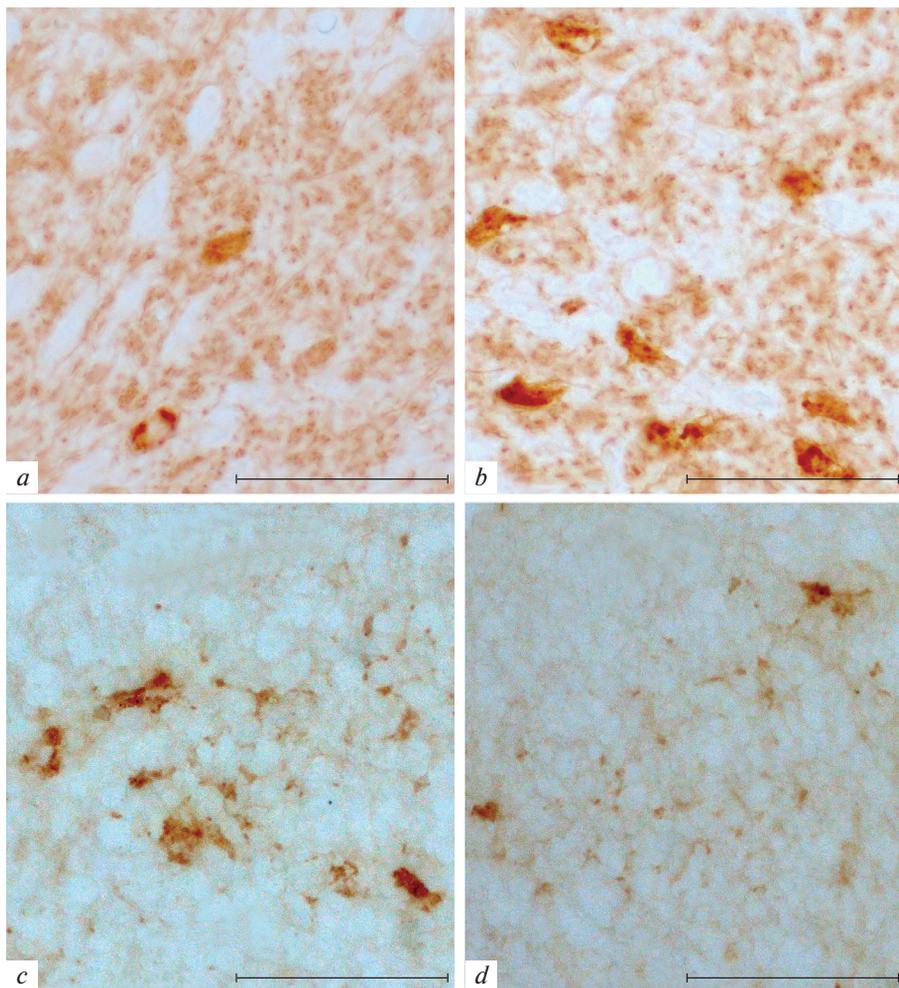


**Рис. 2.** Двойное флуоресцентное иммуномечение орексина-А (*a*, *зеленый*) и орексина-В (*b*, *красный*) и их совмещение (*c*, *желтый*) в нейронах ретикулярного ядра таламуса крысы Вистар. Масштаб: 25 мкм.



**Рис. 3.** Иммунопозитивные к орексину-А клетки, расположенные в роstralной (*a*, *b*), центральной (*c*, *d*) или каудальной (*e*, *f*) областях ретикулярного ядра таламуса крысы Вистар. Масштаб: 50 мкм.

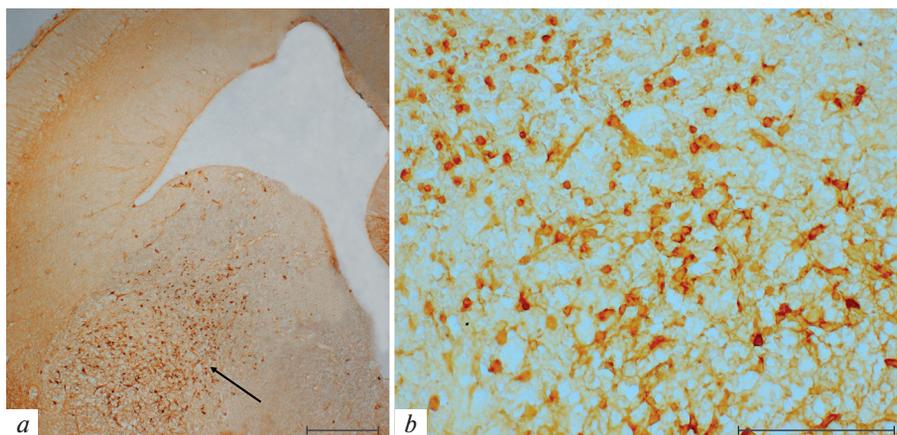
В центральной области ретикулярного ядра таламуса клетки веретеновидной и полигональной формы с несколькими отростками, отходящими от сомы (рис. 3*e*), располагаются латерально, а медиально располагаются более мелкие клетки продолговатой формы (рис. 3*d*). Диаметры орексин-А иммунопозитивных клеток в этой области составляют  $23.4 \pm 0.4$  и  $17.2 \pm 0.3$  мкм,  $18.4 \pm 0.4$  и  $11.5 \pm 0.5$  мкм,  $10.2 \pm 0.2$  и  $8.1 \pm 0.3$  мкм. В каудо-латеральной части ретикулярного ядра таламуса



**Рис. 4.** Иммунопозитивные к орексину-А клетки, расположенные в роstralной (a), центральной (b) и каудальной (c – дорзально, d – вентрально) областях ретикулярного ядра таламуса мыши C57Bl/6J. Масштаб: 50 мкм.

располагаются клетки полигональной формы (рис. 3e), а в каудо-медиальной (рис. 3f) клетки полигональной и вытянутой формы. В клетках каудальной области ретикулярного ядра таламуса (рис. 3e, f) отмечается более слабый уровень иммунореактивности по сравнению с другими областями этого ядра. Диаметры орексин-А иммунопозитивных клеток в этой области составляют  $20.5 \pm 0.4$  и  $18.2 \pm 0.3$  мкм,  $18.4 \pm 0.4$  и  $13.6 \pm 0.4$  мкм.

В мозге мыши расположение ретикулярного ядра таламуса отмечается от  $-0.46$  до  $-2.06$  мм от bregma [36]. В роstralной области рассматриваемого ядра орексин-иммунопозитивные нейроны не формируют компактные группы, отдельные клетки распределены по всей структуре, в них отмечается очень слабый уровень иммунореактивности к орексину-А (рис. 4a) или В. В медиальной области ядра иммунопозитивные клетки расположены более компактно в основном в центральной



**Рис. 5.** Орексин-А-иммунопозитивные клетки в области развивающегося таламуса у 18-дневного эмбриона крысы Вистар. Стрелка – скопление иммунопозитивных клеток (а), которые представлены при большем увеличении (б). Масштаб: 200 мкм (а), 100 мкм (б).

части структуры и проявляют более интенсивную реакцию к орексинам (рис. 4б). В каудальной части ядра выявляются группы клеток, расположенных в дорзальной (рис. 4с) области или мелкие клетки с длинными отростками, расположенные в вентральной области (рис. 4д). Следует отметить, что размер орексин-иммунопозитивных клеток ретикулярного ядра таламуса мышей значительно меньше, чем у крыс Вистар (рис. 3).

У всех исследованных животных визуально отмечается, что размер орексин-иммунопозитивных клеток ретикулярного ядра таламуса меньше, чем клеток перифорникальной области гипоталамуса, а интенсивность реакции к орексину-А или орексину-В в клетках ретикулярного ядра таламуса значительно слабее.

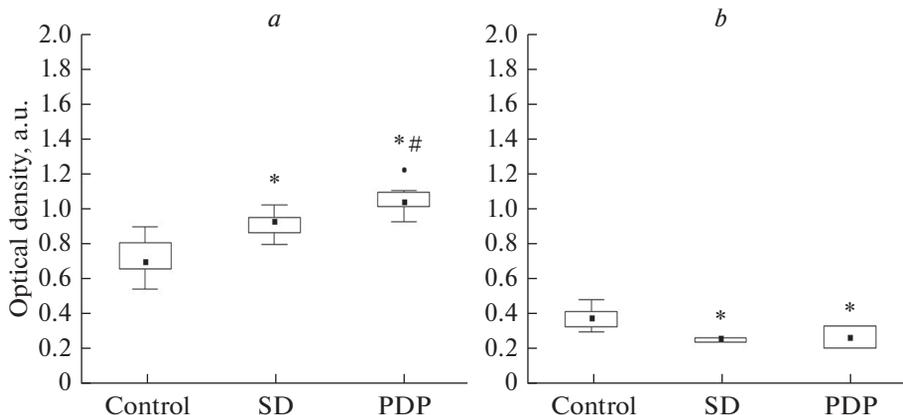
Полученные данные свидетельствуют об экспрессии орексинов различными клетками ретикулярного ядра таламуса у разных видов млекопитающих.

*Анализ развивающегося мозга эмбрионов крысы Вистар E18* свидетельствует о присутствии иммунопозитивных к орексину-А или орексину-В скоплении мелких клеток, которые выявляются в вентральной области развивающегося таламуса, располагающейся дорзо-латерально от полости 3-го желудочка мозга (рис. 5а, б). Клетки округлой формы диаметром 6–7 мкм с короткими, слабо заметными 2–3 отростками. Иммунопозитивный материал выявляется в перикарионе в виде узкого ободка, а также и с меньшей интенсивностью выявляется в отростках (рис. 5б).

У крысы Вистар P14 в ретикулярном ядре таламуса выявляются одиночные слабо-иммунопозитивные к орексину-А или -В клетки.

У крысят Вистар P30 в ретикулярном ядре таламуса выявляется большое количество иммунопозитивных к орексину-А/орексину-В клеток, характер распределения которых соответствует этому ядру взрослой крысы. Однако как и у взрослых крыс, интенсивность реакции в них значительно слабее, чем в нейронах перифорникальной области гипоталамуса.

Полученные данные дают основание предполагать, что развитие орексин-иммунопозитивных клеток ретикулярного ядра таламуса и перифорникальной области, по-видимому, происходит из разных источников в развивающейся нервной ткани, а также отличаются по срокам формирования в ходе постнатального развития организма.



**Рис. 6.** Анализ уровня орексина-А в нейронах перифорникальной области гипоталамуса (а) и ретикулярного ядра таламуса (b) у контрольных крыс Вистар (Control), после депривации сна (SD) и 2-часового постдепривационного периода (PDP).

По оси ординат: оптическая плотность в условных единицах (у.е.). Результаты представлены в виде бокс-плотов, соответствующих 50% (25–75%) данных. Обозначения: черная точка внутри бокса – медиана, линии предела – интерквартильные размахи. Достоверность отличий ( $p < 0.05$ ): \* – по сравнению с контролем, # – по сравнению с депривацией сна.

В эксперименте с депривацией сна у крыс Вистар был проведен сравнительный анализ изменения уровня орексина-А в нейронах перифорникальной области гипоталамуса и ретикулярного ядра таламуса. Полученные данные подтверждают что у контрольных крыс уровень оптической плотности орексина-А в нейронах перифорникальной области значительно выше, чем в ретикулярном ядре таламуса (соответственно  $M = 0.70$  и  $M = 0.38$ ), рис. 6а и b. На фоне депривации сна в клетках перифорникальной области отмечается увеличение уровня орексина-А по сравнению с контролем на 32% ( $M = 0.93, 0.86; 0.95$  и  $M = 0.70, 0.66; 0.80$ ,  $p < 0.05$ ) и еще большее увеличение через 2 ч постдепривационного периода ( $M = 1.04, 1.01; 1.09$ ) как по сравнению с контролем (на 48%,  $p < 0.05$ ), так и с уровнем депривации сна (на 11%,  $p < 0.05$ ; рис. 6а).

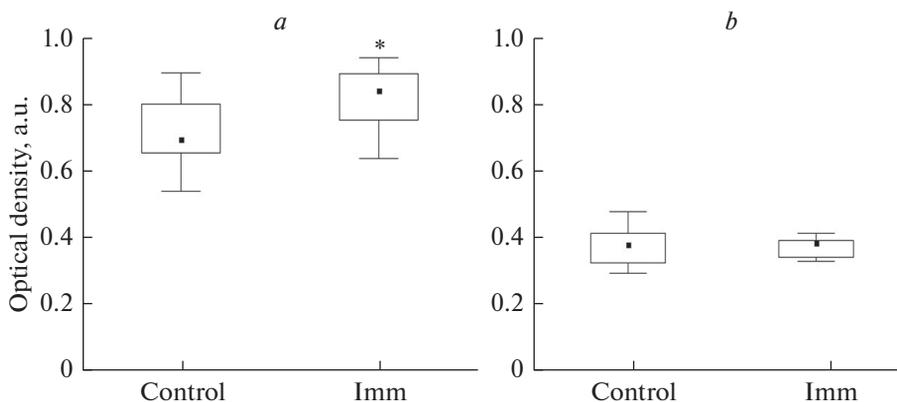
На фоне депривации сна в клетках ретикулярного ядра таламуса отмечается снижение оптической плотности орексина-А на 30% ( $M = 0.26, 0.24; 0.26$ ,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем ( $M = 0.38, 0.32; 0.41$ ) и отсутствие изменений через 2 ч постдепривационного периода ( $M = 0.27, 0.20; 0.33$ , рис. 6b).

При иммобилизационном стрессе у крыс Вистар в нейронах перифорникальной области отмечено увеличение уровня орексина-А по сравнению с контрольным на 20% ( $M = 0.84, 0.76; 0.90$  и  $M = 0.70, 0.66; 0.80$ ,  $p < 0.05$ ; рис. 7а). В клетках ретикулярного ядра таламуса не выявлено достоверных изменений уровня орексина-А ( $M = 0.38, 0.32; 0.41$  и  $M = 0.38, 0.34; 0.39$ , рис. 7б).

Полученные данные демонстрируют противоположные реакции орексин-иммунопозитивных клеток перифорникальной области гипоталамуса и ретикулярного ядра таламуса на различные стрессорные воздействия, что, очевидно, связано с различиями их функционального значения.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Орексин-иммунопозитивные клетки были описаны в латеральном гипоталамусе и области вентрального таламуса [2]. Результаты нашего исследования демонстри-



**Рис. 7.** Анализ уровня орексина-А в нейронах перифорникальной области гипоталамуса (а) и ретикулярного ядра таламуса (b) у контрольных (Control) крыс Вистар и после 3 ч иммобилизации (Imm).

По оси ординат: оптическая плотность в условных единицах (у. е.), результаты представлены в виде бокс-плотов, соответствующих 50% (25–75%) данных. Обозначения: черная точка внутри бокса – медиана, линии предела – интерквартильные размахи, \* – достоверность отличий ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем.

руют присутствие орексинов (А и В) в клетках ретикулярного ядра таламуса у исследованных нами лабораторных животных (две линии крысы и у мыши C57Bl/6J). Анализ препаратов мозга крыс Вистар подтверждают данные о том, что орексины-А и -В колокализуются в одной клетке, а также присутствуют в клетках различной формы и размеров во всех областях ретикулярного ядра таламуса. Эти данные, очевидно, демонстрируют присутствие орексинов в различных типах клеток этого ядра [17], что дает основания предполагать участие орексинов в реализации их функций, в частности в регуляции веретен сна [14]. Полученные нами данные также демонстрируют, что уровень иммунореактивности орексинов в клетках ретикулярного ядра таламуса значительно ниже, чем в гипоталамусе (рис. 6).

Ранее показано, что в эмбриогенезе крысы в мозге орексины начинают идентифицироваться на стадии E12 [38]. У эмбрионов крыс Вистар на стадии E18 орексин-иммунопозитивные клетки выявлены в гиппокампе, дне и стенке 3-го желудочка, а в презумптивной области латерального гипоталамуса выявляются орексин-иммунопозитивные клетки с небольшим количеством иммунопозитивного вещества в перикарионе, но хорошо выраженными отростками [34], что свидетельствует об их дифференцированности. При этом в вентральном таламусе нами были отмечены скопления орексин-иммунопозитивных клеток округлой формы с небольшими отростками, что позволяет рассматривать их как еще недифференцированные структуры.

В постэмбриональном развитии крысят P14 и P30 в латеральном гипоталамусе наблюдаются прогрессивное развитие орексин-иммунопозитивных клеток [8]. При этом в нейронах в области ретикулярного ядра таламуса у крысят P14 наблюдается чрезвычайно слабая иммунореактивность к орексинам, а у крысят P30 уровень развития орексин-иммунопозитивных клеток соответствует таковому у взрослых крыс. Полученные данные демонстрируют более позднее развитие орексин-иммунопозитивных клеток ретикулярного ядра таламуса по сравнению с гипоталамической группой. Кроме того, если источником гипоталамической группы являются клетки, выселяющиеся из стенки и дна 3-го желудочка, то в таламусе, очевидно, другой источник орексин-продуцирующих клеток.

Известно, что орексин-иммунопозитивные нейроны латерального гипоталамуса вовлечены в регуляцию различных функций, в частности в регуляцию цикла бодрствование—сон и стрессорного ответа [5, 8]. Поэтому мы использовали эксперименты с депривацией сна и жесткой иммобилизацией, в которых моделировали нарушение сна и стресс. После депривации сна и в постдепривационный период наблюдаются противоположные реакции орексин-иммунопозитивных клеток перифорникальной области и ретикулярного ядра таламуса. Если после 6 ч депривации сна (рис. 4) в нейронах перифорникальной области гипоталамуса отмечено увеличение уровня орексина-А ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контрольными животными, то в клетках ретикулярного ядра таламуса, напротив, выявлено его уменьшение ( $p < 0.05$ ). Через 2 ч постдепривационного периода в нейронах перифорникальной области гипоталамуса отмечается еще большее увеличение уровня орексина-А, в то время как в ретикулярном ядре таламуса не наблюдается изменения его уровня по сравнению с уровнем при депривации сна.

После 3-часовой иммобилизации в нейронах перифорникальной области также отмечается увеличение уровня орексина-А по сравнению с контролем, в то время как в клетках ретикулярного ядра таламуса не выявлено изменения его уровня (рис. 6).

Полученные данные демонстрируют изменение уровня орексина-А в перифорникальной области как в эксперименте с депривацией сна, так и после иммобилизации. При этом в ретикулярном ядре таламуса изменения наблюдались только после депривации сна.

В настоящее время утвердилось мнение о том, что ретикулярное ядро таламуса является ключевой структурой мозга, которая вовлечена в регуляцию сна как пейсмейкер веретен сна [14]. Полученные нами данные свидетельствуют о вовлечении орексинов, образующихся в клетках этого ядра, в осуществлении этих механизмов, так же как и других пептидов, идентифицированных в данной структуре мозга [19–24]. В этой связи важно отметить тот факт, что у крысы становление цикла бодрствование—сон наблюдается с 30-го дня жизни [8, 39]. Представленные нами данные свидетельствуют о том, что формирование цикла бодрствование—сон связано с началом активного функционирования орексин-иммунопозитивных клеток и в ретикулярном ядре таламуса.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН в рамках государственного задания № 075-0152-22-00.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента (И.Ю.М. и И.В.Р.), проведение экспериментов и сбор материала для исследования (И.Ю.М. и И.В.Р.), обработка результатов (И.Ю.М.), написание и редактирование текста (И.Ю.М. и И.В.Р.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X-B, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik V, Bartlett FS, Frankel WN, Van Den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A Neurobiology* 95 (1): 322–327.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.322>

2. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92 (4): 573–585.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80949-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80949-6)
3. Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2000) Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res* 873(1): 181–187.  
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02555-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02555-5)
4. Sakurai T (2005) Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med Rev* 9(4): 231–241.  
<https://doi.org/10.1016/j.smrv.2004.07.007>
5. Sargin D (2018) The role of the orexin system in stress response. *Neuropharmacology* 154: 68–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.034>
6. Waleh NS, Apte-Deshpande A, Terao A, Ding J, Kilduff TS (2001) Modulation of the promoter region of prepro-hypocretin by alpha-interferon. *Gene* 262 (1–2): 123–128.  
[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00544-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00544-8)
7. Hara J, Yanagisawa M, Sakurai T (2005) Difference in obesity phenotype between orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions. *Neurosci Lett* 380(3): 239–242.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.01.046>
8. Morina IYu, Stankova EP, Romanova IV (2020) Effects of prenatal stress on the formation of the orexinergic system of the hypothalamus in rats. *Neurosci Behav Physiol* 50: 607–617.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00942-x>
9. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot ES (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98 (3): 365–376.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81965-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81965-0)
10. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98(4): 437–451.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81973-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81973-x)
11. Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nature Med* 6(9): 991–997.  
<https://doi.org/10.1038/79690>
12. Abrahamson EE, Leak RK, Moore RYT (2001) The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12(2): 435–440.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-200102120-00048>
13. Herrera CG, Cadavieco MC, Jago S, Ponomarenko A, Korotkova T, Adamantidis A (2016) Hypothalamic feedforward inhibition of thalamocortical network controls arousal and consciousness. *Nat Neurosci* 19: 290–298.  
<https://doi.org/10.1038/nn.4209>
14. Steriade M, Domich L, Oakson G, Deschênes M (1987) The deafferented reticular thalamic nucleus generates spindle rhythmicity. *Neurophysiology* 57(1): 260–273.  
<https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.1.260>
15. Guillery RW, Harting JK (2003) Structure and connections of the thalamic reticular nucleus: advancing views over half a century. *Comp Neurol* 463(3): 360–371.  
<https://doi.org/10.1002/cne.10738>
16. Pinault D (2004) The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res Rev* 46(1): 1–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.04.008>
17. Spreafico R, de Curtis M, Frassoni C, Avanzini G (1988) Electrophysiological characteristics of morphologically identified reticular thalamic neurons from rat slices. *Neuroscience* 27: 629–638.  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90294-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90294-1)
18. Houser CR, Vaughn JE, Barber R.P, Roberts E (1980) GABA neurons are the major cell type of the nucleus reticularis thalami. *Brain Res* 200(2): 341–354.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90925-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90925-7)
19. Lizier C, Spreafico R, Battaglia G (1997) Calretinin in the thalamic reticular nucleus of the rat: distribution and relationship with ipsilateral and contralateral efferents. *Comp Neurol* 377(2): 217–233.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19970113\)377:2<217::aid-cne5>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970113)377:2<217::aid-cne5>3.0.co;2-6)

20. *Bartho P, Payne JA, Freund TF, Acsady L* (2004) Differential distribution of the KCl cotransporter KCC2 in thalamic relay and reticular nuclei. *Eur J Neurosci* 20(4): 965–975. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03562.x>
21. *Contreras-Rodriguez J, Gonzalez-Soriano J, Martinez-Sainz P, Marin-Garcia P, Rodriguez-Veiga E* (2003) Neurochemical heterogeneity of the thalamic reticular and perireticular nuclei in developing rabbits: patterns of calbindin expression. *Brain Res Dev Brain Res* 144(2): 211–221. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(03\)00194-9](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(03)00194-9)
22. *Segerson TP, Hoefler H, Childers H, Wolfe HJ, Wu P, Jackson IM, Lechan RM* (1987) Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain in situ hybridization. *Endocrinology* 121(1): 98–107. <https://doi.org/10.1210/endo-121-1-98>
23. *Burgunder JM, Heyberger B, Lauterburg T* (1999) Thalamic reticular nucleus parcellation delineated by VIP and TRH gene expression in the rat. *Chem Neuroanat* 17(3): 147–152. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(99\)00033-2](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(99)00033-2)
24. *Roland BL, Sutton SW, Wilson SJ, Luo L, Pyati J, Huvar R, Erlander MG, Lovenberg TW* (1999) Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests reticular nucleus regulation of local sleep additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology* 140(12): 5736–5745. <https://doi.org/10.1210/en.140.12.5736>
25. *Crabtree JW* (1996) Organization in the somatosensory sector of the cat's thalamic reticular nucleus. *Comp Neurol* 366(2): 207–222. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960304\)366:2<207::AID-CNE2>3.0.CO;2-9.26](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960304)366:2<207::AID-CNE2>3.0.CO;2-9.26)
26. *Shosaku A, Sumitomo I* (1983) Auditory neurons in the rat thalamic reticular nucleus. *Exp Brain Res* 49(3):432–442. <https://doi.org/10.1007/BF00238784>
27. *Hayama T, Hashimoto K, Ogawa H* (1994) Anatomical location of a taste-related region in the thalamic reticular nucleus in rats. *Neurosci Res* 18(4): 291–299. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(94\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0168-0102(94)90165-1)
28. *Stehberg J, Acuna-Goycolea C, Ceric F, Torrealba F* (2001) The visceral sector of the thalamic reticular nucleus in the rat. *Neuroscience* 106(4): 745–755. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00316-5)
29. *Vantomme G, Osorio-Forero A, Lüthi A, Fernandez LMJ* (2019) Regulation of local sleep by the thalamic reticular nucleus. *Front Neurosci* 13: 576. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00576>
30. *Gonzalo-Ruiz A, Lieberman AR* (1995) GABAergic projections from the thalamic reticular nucleus to the anteroventral and anterodorsal thalamic nuclei of the rat. *Chem Neuroanat* 9 (3): 165–174. [https://doi.org/10.1016/0891-0618\(95\)00078-x](https://doi.org/10.1016/0891-0618(95)00078-x)
31. *Zikopoulos B, Barbas H* (2007) Circuits for multisensory integration and attentional modulation through the prefrontal cortex and the thalamic reticular nucleus in primates. *Rev Neurosci* 18(6): 417–438. <https://doi.org/10.1515/revneuro.2007.18.6.417>
32. *MacDonald EE, Volkoff H* (2010) Molecular cloning and characterization of preproorexin in winter skate (*Leucoraja ocellata*). *Gen Compar Endocrinol* 169(3): 192–196. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2010.09.014>
33. *Romanova IV, Mikhrina AL* (2013) Participation of Agouti related peptide in mechanisms of wakefulness-sleep cycle regulation. *Human Physiol* 39(6): 584–589. PMID: 25509169
34. *Morina IYu, Mikhailova EV, Romanova IV* (2021) Studies of the effects of monoamines on orexinergic neurons in the hypothalamus of rat embryos. *Neurosci Behav Physiol* 51: 350–356. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01078-2>
35. *Paxinos GT, Watson Ch* (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. (Fourth Edition). Acad Press. San Diego, California, USA. Int Standard Book Number: 0-12-547617-5 CD-ROM.
36. *Paxinos G, Franklin KBJ* (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Acad Press 001. Int Standard Book Number: 0-12-547636-1 CD-ROM.
37. *Coggeshall RE* (1964) A Study of diencephalic development in the albino rat. *J Comp Neurol* 122(2): 241–299. <https://doi.org/10.1002/cne.901220208>
38. *Steininger TL, Kilduff TS, Behan M, Benca RM, Landry CF* (2004) Comparison of hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain. *J Chem Neuroanat* 27(3): 165–181. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.02.007>
39. *Aristakesian EA* (1997) Comparative neurophysiological analysis of the waking-sleeping cycle during the early postnatal ontogeny in rats and guinea pigs. *J Evol Biochem Physiol* 33(6): 545–550.

**Orexin-Immunopositive Structures of the Reticular Nucleus of the Thalamus****I. Yu. Morina<sup>a</sup> and I. V. Romanova<sup>a, \*</sup>**

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

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

In laboratory mammals (adult Wistar and Sprague-Dawley rats, C57Bl/6J mice), orexin-A and orexin-B were detected in the neurons of different areas of the reticular thalamic nucleus, the level of immunoreactivity of which is significantly lower than in the neurons of the perifornical region of the hypothalamus. On Wistar rats in experiments with 6-hour sleep deprivation and 3-hour immobilization on the back revealed multidirectional reactions of orexin-immunopositive neurons in these brain structures. It has been shown that during the embryonic development of the Wistar rat in the thalamus, orexin-immunopositive structures are identified already at the E18 stage, are poorly developed at the P14 stage, and form to the 30th day of life, which coincides with the period of formation of the wakefulness-sleep cycle in the rat. The obtained data indicate that orexins of the reticular thalamic nucleus are also involved in the regulation of the sleep-wake cycle.

*Keywords:* orexins, reticular thalamic nucleus, hypothalamus, ontogeny, sleep deprivation, stress

## ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА АУДИОГЕННЫЕ СУДОРОГИ И КАТАЛЕПСИЮ КРЫС ЛИНИЙ КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ И “0”

© 2022 г. Н. М. Сурина<sup>1</sup>, \*, И. Б. Федотова<sup>1</sup>, И. И. Полетаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

\*E-mail: Opera\_ghost@inbox.ru

Поступила в редакцию 10.04.2022 г.

После доработки 06.05.2022 г.

Принята к публикации 11.05.2022 г.

Дексаметазон – синтетический глюкокортикостероид, обладающий противовоспалительным и иммуносупрессивным действием. С целью выявления новых мишеней для фармакотерапии, а также для исследования иммунных механизмов в патогенезе эпилепсии проводили изучение влияния дексаметазона на аудиогенную эпилепсию и каталепсию крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ). Хроническое (но не однократное) введение дексаметазона вызвало снижение интенсивности судорожных эпилептиформных припадков в ответ на звук у крыс линии КМ с высокой предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии, однако сопровождалось гибелью части животных. Через 1 мес. после прекращения введения дексаметазона интенсивность аудиогенных судорожных припадков у выживших крыс КМ восстановилась до уровня контроля. У крыс линии “0”, селективной из гибридов F2 КМ × Вистар на отсутствие аудиогенной эпилепсии, гибели после хронического введения дексаметазона не зарегистрировано. При остром и хроническом введении дексаметазона у крыс линии “0” при отсутствии припадка после действия сильного звука появилась каталепсия, тогда как аудиогенный судорожный припадок обнаружился только у одного животного. У крыс КМ после хронического введения дексаметазона проявление постиктальной каталепсии было ослаблено по сравнению с контролем. Таким образом, в патогенезе аудиогенной эпилепсии задействованы провоспалительные механизмы. Дексаметазон оказал отчетливый противосудорожный эффект при хроническом введении.

*Ключевые слова:* аудиогенная эпилепсия, каталепсия, крысы, линия Крушинского–Молодкиной, линия “0”, дексаметазон

DOI: 10.31857/S0869813922060097

Эффекты большинства современных противоэпилептических препаратов связаны с модуляцией нейротрансмиттерных систем мозга (моноаминергической, ГАМК- и глутаматергической и др.) [1]. В то же время накапливаются как клинические, так и экспериментальные свидетельства участия в эпилептогенезе про- и противовоспалительных систем мозга [2–4]. Это в определенной степени отражает также и множественность форм эпилепсии как заболевания с судорогами разных типов и разными синдромами [1].

В ряде экспериментальных исследований и обзоров отмечено, что стресс-реакция, которая в своем формировании связана с активацией и симпато-адреналовой,

и гипоталамо-гипофиз-надпочечниковой (ГГН) систем, сопровождается развитием судорог разной этиологии, в которые вовлечены и про- и противовоспалительные системы мозга [5–10]. Следует отметить, что и у больных эпилепсией, и в экспериментах с эпилептиформными судорогами на лабораторных моделях отмечен целый ряд особенностей экспрессии цитокинов, в частности IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  [10, 12]. Это указывает на их возможную роль в эпилептогенезе [8, 13–16]. Один из путей анализа этой сложной системы и стресс-реактивности, в частности, является использование фармакологических агентов. Дексаметазон (далее – ДМ) – синтетический глюкокортикостероид, эффекты которого сходны с таковыми гормонов коры надпочечников [17]. ДМ обладает противовоспалительным и иммуносупрессивным действием – подавляет синтез IL-2 в лимфоцитах [18] и ингибирует секрецию CRF и АКТГ [19, 20]. В то же время в клинике уже через 5–7 дней введения больным терапевтических доз ДМ возможно наблюдать побочное его действие – отмечают развитие вторичной недостаточности надпочечников с угнетением ГГН системы [21]. Показано влияние ДМ на иммунную систему человека – снижение количества Т-хелперов 1-го и 2-го типа и уменьшение образования TNF, IL-1, IL-2 и других цитокинов [22–24]. Было также отмечено и положительное терапевтическое влияние ДМ – у больных рефрактерной формой эпилепсии добавление ДМ к стандартным противосудорожными препаратами вызывало прекращение судорог [24].

Эксперименты с хроническими моделями эпилепсии выявили повышение экспрессии IL-1 $\beta$  в некоторых отделах мозга при развитии судорог [25], тогда как ДМ ингибировал экспрессию как IL-1 $\beta$ , так и многих других цитокинов через рецепторы глюкокортикостероидов [26, 27]. Интенсивность судорог (в модели литий-пилокарпиновой эпилепсии) снизилась при действии 10 мг/кг ДМ с ослаблением процесса гибели клеток в поле CA1 (характерную для эпилептогенеза в этой модели) [28]. При этом была отмечена активация антиоксидантной системы и усиление продукции IL-10 с подавлением маркеров воспаления. Острое введение ДМ (в дозах 0.5, 1, 3 и 5 мг/кг) приводило к достоверному ослаблению судорог, вызванных 4-аминопиридином, а также к дозозависимому достоверному уменьшению опосредованной судорогами иммунореактивности (по данным экспрессии гена *c-fos*) в новой коре, хилусе зубчатой фасции и гиппокампе [29]. Было также показано, что ДМ блокирует судороги, генез которых связан с мю- и дельта-опиоидными системами [30].

Таким образом, глюкокортикоиды (и ДМ) по-разному модулировали судорожную готовность, вероятно, в зависимости от индивидуальных особенностей больных эпилепсией и/или от специфических свойств разных экспериментальных моделей [5, 31–33]. В то же время оценка влияния гормонов стресса, как правило, не учитывает возможные генотипические различия как в стресс-реактивности, так и в реакции на введение физиологически активных соединений. В то же время проявление “абсанс-эпилепсии” у крыс WAG/Rij (с несудорожной формой эпилепсии) зависело и от введения кортикостерона [34], и от подъема его уровня при стрессе [14]. У линий мышей с разным уровнем судорожной готовности реакции на введение аллопрегнанолона также различались [35]. У крыс линии WAR (Wistar Audiogenic rats) в сравнении с контрольными крысами Вистар [36, 37] отмечены различия в стресс-реактивности. В то же время влияние глюкокортикоидов на развитие судорожных эпилептиформных припадков у животных разных генотипов исследовано недостаточно.

В настоящей работе оценивали влияние ДМ на показатели аудиогенной эпилепсии (АЭ) и на постиктальную каталепсию у крыс с высокой предрасположенностью к АЭ (линия Крушинского–Молодкиной, далее КМ) и крыс, устойчивых к ней (линия “0”).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Экспериментальные животные.* В работе были использованы 5–6-месячные крысы-самцы линии КМ ( $n = 61$ ) с максимальной интенсивностью аудиогенного эпилептиформного припадка (АП) и крысы-самцы линии “0” ( $n = 13$ ). Линия селектирована из популяции гибридов F2 КМ × Вистар на отсутствие судорожной реакции на сильный звук [38]. В экспериментах были использованы только те особи линии “0”, у которых в возрасте 3 мес. не было АП (балл “0”) при трех звуковых экспозициях, проведенных с интервалом в 4–7 дней. Интенсивность АП у крыс КМ тестировали однократно в возрасте 3 мес. Эти линии поддерживаются в лаборатории физиологии и генетики поведения (кафедра высшей нервной деятельности) Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Животные содержались в пластиковых клетках (размер  $35 \times 56 \times 20$  см) по 4–6 особей в каждой со свободным доступом к корму (ООО фирма Лабораторкорм) и воде с естественной сменой освещенности.

*Тестирование реакции крыс на звук* проводили в прозрачной звукоизолирующей камере (размер  $40 \times 30 \times 50$  см). Звук (аудиторный звонок, 120 дБ) подавали через 20–30 с после помещения животного в камеру, и он действовал 90 с (в случае отсутствия реакции), при развитии тонических судорог звук выключали. Интенсивность судорог оценивали по принятой в лаборатории шкале [39]. В соответствии с этой шкалой – “0” – это отсутствие реакции на звук, “1” – фаза “клонического бега” (или двигательного возбуждения) – беспорядочный бег и прыжки, “2” – клонические судороги в положении крысы на животе, “3” – тонические судороги всего тела с падением животного на бок, “4” – тонические судороги мускулатуры всего тела с экстензией конечностей и временной остановкой дыхания. Вручную регистрировали латентные периоды (ЛП) начала фаз припадка.

После выключения звука и выхода крысы из АП регистрировали наличие или отсутствие у животного так называемой постиктальной катаlepsии – катаlepsидного нарушения мышечного тонуса (“восковая гибкость”), когда животному можно придать произвольную позу (например, поставив на задние лапы), которую оно поддерживает достаточно долго. Наличие этой катаlepsии (“постиктальной” в случае развития АП, и после действия звука – у крыс линии “0”) проверяли в течение трех 5-минутных интервалов после окончания действия звука [40].

Кроме того, в эксперименте с серийным (6 дней) введением ДМ сразу после окончания его инъекций у крыс линии КМ тестировали наличие “фоновой” катаlepsии. Для этого крысе, находящейся в домашней клетке в спокойном состоянии, осторожно приподнимали передние лапы с помощью тонкого деревянного стержня. Сохранение животным приданной ему искусственной позы в течение 10–15 с принимали за проявление “фоновой катаlepsии” [41].

*Введение ДМ.* Внутрибрюшинное введение ДМ (фирма “КРКА, Ново место”, дозы 4 и 10 мг/кг) или физиологического раствора (ФР) проводили с использованием стерильных одноразовых шприцов. В серии с однократным введением ДМ тестирование АЭ начинали через 3 ч после инъекции. В серии с 6-дневным введением ДМ (или ФР) животных тестировали в день последней инъекции через 3 ч после нее. Поскольку использованные в работе крысы КМ и “0” были охарактеризованы по выраженности АЭ в возрасте 3 мес, их исходные показатели также использовались как контрольные величины.

*Биоэтические требования.* Во всех экспериментах содержание животных и использованные процедуры соответствовали биоэтическим требованиям Декларации ЕС (Declaration ES 2010).

*Статистические методы.* Обработка результатов проводилась с помощью стандартного пакета программ Statistica 6.0. Использовали непараметрический критерий

**Таблица 1.** Латентный период АП и наличие постиктальной катаlepsии у самцов крыс линии КМ через 3 ч после однократного введения ДМ

Группа, доза ДМ	ЛП начала АП, с	ЛП фазы тонических судорог, с	Доли (в %) животных, обнаруживших катаlepsию в разные интервалы времени после АП		
			1–5 мин	5–10 мин	>10 мин
Контроль, $n = 9$	$3.3 \pm 0.4$	$14.1 \pm 0.9$	100	100	88.9
ДМ, 4 мг/кг, $n = 7$	$1.7 \pm 0.3$	$10.4 \pm 0.4$	100	57.1*	57.1
ДМ, 10 мг/кг, $n = 11$	$3.0 \pm 0.4$	$11.4 \pm 0.7$	81.8	81.8	72.7

$n$  – число животных. \* – достоверно ( $p < 0.05$ ) отличается от показателя контрольной группы (критерий  $\phi$  Фишера для оценки достоверности разности альтернативных долей).

**Таблица 2.** Интенсивность аудиогенного эпилептиформного припадка у самцов крыс линий КМ и “0” в контроле (интактные и ФР) и после введения 10 мг/кг ДМ в течение 6 дней

Группа – ДМ, ФР, интактные $n$ – число животных	ЛП начала АП, с	Ср. балл АП	ЛП конечной фазы АП, с	Две “волны” фазы клон. бега, %
КМ интактные (до ДМ), $n = 16$	$2.9 \pm 0.3$	$3.9 \pm 0.05$	$13.0 \pm 0.6$	0
КМ интактные (до ФР) $n = 6$	$5.5 \pm 2.5$	$3.7 \pm 0.1$	$15.0 \pm 0.5$	0
КМ, ФР, $n = 6$	$4.0 \pm 1.36$	4.00	$14.2 \pm 2.1$	0
КМ, ДМ, $n = 15^{\S}$	$6.1 \pm 0.6^*$	$2.40 \pm 0.2^*$	$29.6 \pm 4.2^*$	46.7 <sup>&amp;</sup>
Линия “0”, ФР, $n = 6$	–	0 #	–	–
Линия “0”, ДМ, $n = 6$	–	0	–	–

\* – достоверно отличается от показателя группы с введением ФР,  $p < 0.001$ , # – достоверно отличается от показателя обеих контрольных групп КМ,  $p < 0.001$ , & – достоверно отличается от показателя интактного контроля,  $p < 0.001$  (критерий  $\phi$  Фишера для оценки достоверности разности альтернативных долей). <sup>§</sup> – в группе КМ, ДМ, одно животное погибло сразу после инъекции, до тестирования.

рий Манна–Уитни. Доли животных группы, обнаруживших АП, считали по методу  $\phi$  (достоверность разности альтернативных долей). Для определения достоверности разности между выборочными долями использовали  $t$ -критерий Стьюдента с применением вспомогательной переменной Фишера “ $\phi$ ”.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Крысы линии КМ.* Однократное введение ДМ в дозах 4 и 10 мг/кг (в 1 мл,  $n = 7$  и 11 соответственно) не привело к изменению интенсивности АП по сравнению с ее исходной величиной. В то же время произошли изменения в проявлении постиктальной катаlepsии. У крыс группы ДМ 4 мг/кг она была менее длительной – в интервале 5–10 мин (после выхода животного из припадка) катаlepsия была выявлена у достоверно ( $p < 0.05$ ) меньшего числа особей. В то же время в группе с дозой ДМ 10 мг/кг такого эффекта не наблюдалось (табл. 1).

В табл. 2 приведены показатели АП “опытной” группы крыс линии КМ как до введения (тестирование в возрасте 3 месяцев), так и после введения ДМ. Аналогично представлены данные по введению ФР контрольной группе – до серии инъекций ФР (в возрасте 3 месяцев) и после 6 дней контрольных инъекций ФР. Введение ДМ крысам КМ в течение 6 дней достоверно увеличило ЛП начала припадка ( $6.1 \pm 0.6$  против  $2.9 \pm 0.3$ ,  $p < 0.001$ ) и, что еще более показательнее, снизило интен-

**Таблица 3.** Катаlepsия (доля животных в %) у самцов крыс линий КМ и “0” после 6 дней введения ДМ (10 мг/кг, внутривбрюшинно) и в контроле

Группа, <i>n</i> – число животных	Наличие катаlepsии после АП		
	1–5 мин	5–10 мин	10 мин и более
КМ интактные (до ДМ), <i>n</i> = 16	100	100	87.5
КМ интактные (до ФР), <i>n</i> = 6	83.3	66.7	66.7
КМ, ФР, <i>n</i> = 6	100	100	100
КМ, ДМ, <i>n</i> = 15	93.3	80.0	46.7*
Линия “0”, <i>n</i> = 6	0#	0#	0#
Линия “0”, ДМ, <i>n</i> = 6	50.0	16.7	0

\* Достоверно отличается от показателя интактного контроля,  $p < 0.05$ , # – достоверно отличается от показателя КМ,  $p < 0.001$ .

сивность судорог ( $2.40 \pm 0.16$  балла против  $3.91 \pm 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). У 46.7% крыс (7 из 15) в фазе клонического бега обнаружили две “волны” двигательной активности животных, разделенные тормозной паузой, что свидетельствует о снижении уровня предрасположенности к АП [43]. ЛП начала фазы тонических судорог АП также увеличился –  $29.6 \pm 4.2$  против  $13.0 \pm 0.6$  ( $p < 0.001$ ). Однако клонические судороги у животных сохранялись (чаще всего без перехода в тонические судороги, если же они все же наблюдались, то речь шла о неполных тонических судорогах передней пары конечностей).

Таким образом, можно говорить о противосудорожном эффекте 6-дневного введения ДМ. Доля животных с постиктальной катаlepsией у крыс КМ после ДМ снизилась для интервала времени от 5 до 10 мин ( $p < 0.05$ ) (табл. 3).

По окончании хронического введения ДМ у 13.3% крыс КМ (у 2 животных из 15) была выявлена “фоновая” катаlepsия, которая проявлялась без действия звука.

Из 16 крыс линии КМ группы с серийным введением ДМ одна погибла сразу после шестой инъекции ДМ, а 5 крыс погибли в течение недели после прекращения его введения. Через 1 месяц после серийного введения ДМ интенсивность АП выживших крыс линии КМ этой группы полностью восстановилась, т.е. вернулась к уровню, который у них был в возрасте 3 месяцев (4.0 балла). Таким образом, была показана достаточно высокая токсичность ДМ. Курсовое введение аналогичного объема ФР (1 мл) не вызвало достоверных изменений в характеристиках АП и катаlepsии.

*Крысы линии “0”.* У крыс линии “0” после однократного введения 4 мг/кг ДМ была обнаружена “аудиогенная”, “послезвуковая” катаlepsия – т.е. нарушения мышечного тонуса после прекращения действия звука, который у них не вызывал АП. До введения ДМ (т.е. в отсутствие АП у крыс этой линии) ее не наблюдали ни у одного животного, тогда как после введения ДМ (в отсутствие АП) она выявилась у 4 из 5 крыс линии “0”. Отметим, что у одной крысы линии “0” обнаружился АП. В течение первых 5 мин наблюдения катаlepsия после прекращения действия звука выявилась у 5 крыс из 6 (83.3%,  $p < 0.01$ ) “Послезвуковая” катаlepsия присутствовала у крыс линии “0” и в более поздние интервалы времени после выключения звука. В интервале 5–10 мин (по окончании звука) она была у 2 крыс из 6 (33.3%), в интервале более 10 мин – у 1 крысы из 6 (16.7%).

Введение ДМ в течение 6 дней крысам линии “0” не вызвало изменений в их реакции на звук, АП у них не было. В то же время у 3 крыс линии “0” из 6 обнаружилась “послезвуковая” катаlepsия (которой не было в контроле). Как и после одно-

кратного введения ДМ она была наиболее четко выражена в интервале 0–5 мин после выключения звука, а у некоторых животных она длилась и дольше (табл. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние ДМ на аудиогенную эпилепсию крыс линии КМ обнаружилось только после его хронического (6-дневного) введения. После окончания введения ДМ ЛП начальных фаз АП (“клонического бега” и клонических судорог) значительно увеличился, тонические же судороги либо отсутствовали, либо развивались с достоверно более длинным ЛП. Интенсивность судорожного припадка снизилась у всех тестированных животных. Иными словами, 6-дневное введение ДМ вызвало четкий противосудорожный эффект. В то же время оно не повлияло на выраженность постиктальной катаlepsии у крыс КМ. У крыс линии “0” (с отсутствием судорог в ответ на звук) изменений в реакции на предъявление звука *per se* не было (АП обнаружился только у одного животного). Однако после введения ДМ у крыс этой линии обнаружилась катаlepsия, которую вызывало *только действие звука* и которой не было у контрольных животных. Таким образом, эти результаты свидетельствуют о генотип-зависимых эффектах хронического введения ДМ у крыс двух линий.

На небольших выборках крыс линий КМ, “0” и Вистар (с отсутствием АП) были обнаружены некоторые различия в уровне кортикостерона плазмы крови [42]. В “фоне”, т.е. без резких внешних воздействий, уровень кортикостерона у крыс линии “0” был выше, чем у линии КМ и достоверно ( $p < 0.05$ ) выше, чем у Вистар (которые, как и крысы “0”, не проявляли АП). У крыс КМ и “0” в фоне, через 2–3 мин и через 30 мин после действия звука изменений этого показателя не выявилось, тогда как у крыс Вистар данный показатель через 30 мин после действия звука был достоверно ( $p < 0.05$ ) выше, чем в фоне. Эти данные могут быть предварительным свидетельством отсутствия прямой связи АП с функцией оси НРА, а также сложной картины фенотипа АП, изменяющегося под влиянием кортикостероида ДМ.

Следует отметить, что введение ДМ может изменить не только показатели АП крыс КМ (т.е., в частности, возбудимость ЦНС), но и вызвать изменения иммунных процессов. Противосудорожный эффект ДМ при его курсовом введении можно объяснить его влиянием на систему контроля воспаления. Он снижает синтез провоспалительных цитокинов [43], а также уровни TNF- $\alpha$  и интерлейкина 1- $\beta$  в гиппокампе и TNF- $\alpha$  в сыворотке крови [44]. Введение ДМ снизило частоту разрядов нейронов гиппокампа при эпилептическом статусе, а также, как было показано и в работе [43], продукцию провоспалительных цитокинов [44]. ДМ предотвращал астроглиоз (литий-пилокарпиновая модель эпилепсии) одновременно с модуляцией уровней интерлейкина 1- $\beta$  и TNF- $\alpha$  в гиппокампе [46]. Можно предположить, что такие же изменения после введения ДМ могут развиваться и в структурах, критичных для АП – в нижнем двухолмии и стволе мозга.

В целом можно предположить, что эффекты хронического введения ДМ могут быть связаны не с развитием стресс-реакции как таковой, а с влиянием этого кортикостероида на функции системы про- и противовоспалительной системы мозга.

Однако есть и другое, частично альтернативное объяснение выявленного эффекта ДМ на крыс линий КМ и “0”. Если состояние катаlepsии (в частности, как в нашем случае, “звук-индуцированной” у крыс без АП) рассматривать как “гиподинамический полюс” реакции организма на действие сильного звука (потенциального стрессора), то усиление катаlepsии у крыс линии “0” можно предположительно объяснить подавляющим действием ДМ на секрецию кортикотропин-рилизинг-фактора и адренкортикотропного гормона.

В то же время такой признак, как снижение интенсивности АП у крыс линии КМ проявился при использовании режима 6-дневного введения ДМ, вызвавшего токсические эффекты – гибель части животных. Причиной этого может быть описанная в клинике вторичная надпочечниковая недостаточность (вплоть до необратимой атрофии коры надпочечников) [47]. Отметим, что смертности крыс линии “0” (то есть животных без АП) обнаружено не было.

Система регуляции мышечного тонуса (и развитие каталепсии в частности) достаточно сложна, как сложны и влияния на нее уровня глюкокортикоидов [48–50]. Ранее было показано, что в фоне, без фармакологических воздействий, линии КМ и “0” различались по плотности D2- и NMDA-рецепторов в стриатуме [51], что не исключает участия в генезе каталепсии и структур ствола, связанных с развитием АП [52]. Эта форма каталепсии отличается от известной типичной “галоперидоловой” [53]. Возможная связь между состоянием ГАМК-ергической системы мозга и эффектами ДМ (хотя и “обратная” по знаку с данными, полученными в настоящей работе) была также описана для ряда поведенческих реакций, в том числе и для фармакологической каталепсии [48, 49].

Полученные данные впервые показали возможность модуляции показателей судорожного эпилептиформного припадка в ответ на сильный звук путем хронического введения ДМ, однако выявили и негативные последствия его действия.

## ВЫВОДЫ

1. Хроническое (но не однократное) введение дексаметазона вызвало снижение интенсивности судорожных эпилептиформных припадков в ответ на звук у крыс линии КМ с высокой предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии.

2. Противосудорожный эффект хронического введения дексаметазона сопровождался гибелью части крыс КМ опытной группы, у крыс линии “0” гибели не зарегистрировано.

3. При остром и хроническом введении у крыс линии “0”, не предрасположенных к аудиогенной эпилепсии, дексаметазон вызвал появление каталепсии после действия сильного звука, но не аудиогенных судорожных припадков.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Госпрограммой Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова №.121032500080–8 и Междисциплинарной научной и образовательной Школой Московского государственного университета “Мозг, Когнитивные системы, Искусственный интеллект”.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Н.М.С. – проведение экспериментов, первичная обработка, подготовка рукописи, И.Б.Ф. – обеспечение экспериментальной базы, обработка данных, редактирование рукописи, И.И.П. – подготовка рукописи

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Svob Strac D, Pivac N, Smolders IJ, Fogel WA, De Deurwaerdere P, Di Giovanni G* (2016). Monoaminergic Mechanisms in Epilepsy May Offer Innovative Therapeutic Opportunity for Monoaminergic Multi-Target Drugs. *Front Neurosci* 10: 492. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00492>

2. *Fazilet D, Karadenizli S, Özsoy OD, Eraldemir FC, Şahin D, Ateş N* (2017) The Effects of Adenosinergic Modulation on Cytokine Levels in a Pentylentetrazole-Induced Generalized Tonic-Clonic Seizure Model. *Neuroimmunomodulation* 24(1): 54–59.
3. *Aydın L, Erkan Y, Yeşim K, Taner S, Ersin O* (2017) Effect of melatonin on cytokine levels in a hyperthermia-induced febrile seizure model. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 63(11): 11–16.
4. *Rincón-López C, Tlapa-Pale A, Medel-Matus JS, Martínez-Quiroz J, Rodríguez-Landa JF, López-Meraz ML* (2017) Interleukin-1 $\beta$  increases neuronal death in the hippocampal dentate gyrus associated with status epilepticus in the developing rat. *Neurologia* 32(9): 587–594.
5. *Sawyer NT, Escayg A* (2010) Stress and epilepsy: multiple models, multiple outcomes. *J Clin Neurophysiol* 27(6): 445–452.  
<https://doi.org/10.1097/WNP.0b013e3181fe0573>
6. *Godoy LD, Rossignoli MT, Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, Umeoka EHL* (2018) A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. *Front Behav Neurosci* 12, 127.
7. *de Deus JL, Amorim MR, de Barcellos Filho PCG, de Oliveira JAC, Batalhão ME, Garcia-Cairasco N, Cárnio EC, Leão RM, Branco LGS, Cunha AOS* (2020) Inflammatory markers in the hippocampus after audiogenic kindling. *Neurosci Lett* 721: 134830. NT  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134830>
8. *Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, Ravizza T, Perego C, De Simoni MG* (2002) Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia* 43. Suppl 5: 30–35.
9. *Espinosa-Garcia C, Zeleke H, Ashebo RA* (2021) Impact of Stress on Epilepsy: Focus on Neuroinflammation – A Mini Review Neuroinflammation – A Mini Review. *Int J Mol Sci* 22: 4061.
10. *Horvath RA, Sütő Z, Cseke B, Schranz D, Darnai G, Kovacs N, Janszky I, Janszky J* (2022) Epilepsy is overrepresented among young people who died from COVID-19: Analysis of nationwide mortality data in Hungary. *Seizure: Eur J Epilepsy* 94: 136–141.
11. *Lehtimäki KA, Keränen T, Palmio J, Mäkinen R, Hurme M, Honkaniemi J, Peltola J* (2011) Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. *Acta Neurol Scand* 116(4): 226–230.
12. *Li G, Bauer S, Nowak M, Norwood B, Tackenberg B, Rosenow F, Knake S, Oertel WH, Hamer HM* (2011) Cytokines and epilepsy. *Seizure* 20(3): 249–256.
13. *Plata-Salaman CR, Ilyin SE, Turrin NP, Gayle D, Flynn MC, Romanovitch AE Kelly ME, Bureau Y, Anisman H, McIntyre DC* (2000) Kindling modulates the IL-1 $\beta$  system. TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 75(2): 248–258.
14. *Tolmacheva EA, Oitzl MS, van Luijckelaar G* (2012) Stress, glucocorticoids and absences in a genetic epilepsy model. *Horm Behav* 61(5): 706–710.  
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.03.004>
15. *Kalueff AV, Lehtimäki KA, Ylinen A, Honkaniemi J, Peltola J* (2004) Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced seizures in rats. *Neurosci Lett* 365(2): 106–110.
16. *Balosso S, Ravizza T, Perego C, Peschon, Campbell IL, De Simoni MG, Vezzani A* (2005) Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Ann Neurol* 57: 804–812.
17. *Benedek TG* (2011) History of the development of corticosteroid therapy. *Clin Exp Rheumatol* 29(5 Suppl 68): S5–S12.
18. *Giles AJ, Hutchinson MND, Sonnemann HM, Jung J, Fecci PE, Ratnam NM, Zhang W, Song H, Bailey R, Davis D, Reid CM, Park DM, Gilbert MR* (2018) Dexamethasone-induced immunosuppression: mechanisms and implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer* 6(1): 51.  
<https://doi.org/10.1186/s40425-018-0371-5>
19. *Ghanshyam N, Pandey HS, Rizavi RB, Xinguo R* (2019) Increased protein and mRNA expression of corticotropin-releasing factor (CRF), decreased CRF receptors and CRF binding protein in specific postmortem brain areas of teenage suicide subjects. *Psychoneuroendocrinology* 106: 233–243.
20. *Smits HHK, Grünberg K, Derijk RH, Sterk PJ, Hiemstra PS* (1998). Cytokine release and its modulation by dexamethasone in whole blood following exercise. *Clin Exp Immunol* 111(2): 463–468.
21. *Rensen N, Gemke RBJ, van Dalen EC, Rotteveel J, Kaspers GJL* (2017) Hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis suppression after treatment with glucocorticoid therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cochrane Database Syst Rev* 11(11): CD008727.
22. *Mariann F, Petrovski G, Pásztor D, Gogolák P, Rajnavölgyi E, Berta A* (2014) Effects of Awakening and the Use of Topical Dexamethasone and Levofloxacin on the Cytokine Levels in Tears Following Corneal Transplantation. *J Immunol Res* 2014: 570685.
23. *Geeta R, Olivia C, Meisner OC, Philipp MT* (2015) Anti-inflammatory effects of dexamethasone and meloxicam on *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation in neuronal cultures of dorsal root ganglia and myelinating cells of the peripheral nervous system. *J Neuroinflammation* 12: 240.

24. Ramos AB, Cruz RA, Villemarette-Pittman NR, Olejniczak PW, Mader Jr EC (2019) Dexamethasone as Abortive Treatment for Refractory Seizures or Status Epilepticus in the Inpatient Setting. *J Investig Med High Impact Case Rep* 7: 2324709619848816. <https://doi.org/10.1177/2324709619848816>
25. Webster KM, Sun M, Crack P, O'Brien TJ, Shultz SR, Semple BD (2017) Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 14(1): 10. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0786-1>
26. Jeon YJ, Han SH, Lee YW, Lee M, Yang KH, Kim HM (2000) Dexamethasone inhibits IL-1 beta gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF-kappa B/Rel and AP-1 activation. *Immunopharmacology*. 48(2): 173–183. [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(00\)00199-5](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(00)00199-5)
27. Jang BC, Lim KJ, Suh MH, Park JG, Suh SI (2007) Dexamethasone suppresses interleukin-1beta-induced human beta-defensin 2 mRNA expression: involvement of p38 MAPK, JNK, MKP-1, and NF-kappaB transcriptional factor in A549 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(1): 171–184. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00293.x>
28. Al-Shorbagy MY, Bahia M, El Sayeh BM, Abdallah DM (2012) Diverse effects of variant doses of dexamethasone in lithium-pilocarpine induced seizures in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 90(1): 13–21.
29. Fazekas I, Szakacs R, Mihaly A, Zador Z, Krisztin-Peva B, Juhasz A, Janka Z (2006) Alterations of seizure-induced c-fos immunolabelling and gene expression in the rat cerebral cortex following dexamethasone treatment. *Acta Histochem* 108: 463–473.
30. Di Giannuario A, Pieretti S, Sagratella S, Loizzo A (2001) Dexamethasone blocking effects on mu- and delta-opioid-induced seizures involves kappa-opioid activity in the rabbit. *Neuropsychobiology* 43(3): 213–220. <https://doi.org/10.1159/000054892>
31. Roberts AJ, Keith LD (1995) Corticosteroids enhance convulsion susceptibility via central mineralocorticoid receptors. *Psychoneuroendocrinology* 20(8): 891–902. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(95\)00016-x](https://doi.org/10.1016/0306-4530(95)00016-x)
32. Reddy DS (2013) Role of hormones and neurosteroids in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* 31(7): 115. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00115>
33. Sawyer NT, Papale LA, Eliason J, Neigh GN, Escayg A (2014) Scn8a voltage-gated sodium channel mutation alters seizure and anxiety responses to acute stress. *Psychoneuroendocrinology* 39: 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.09.018>
34. Schridde U, van Luijckelaar G (2004) Corticosterone increases spike-wave discharges in a dose- and time-dependent manner in WAG/Rij rats. *Pharmacol Biochem Behav* 78(2): 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.04.012>
35. Beckley EH, Fretwell AM, Tanchuck MA, Gililand KR, Crabbe JC, Finn DA (2008) Decreased anticonvulsant efficacy of allopregnanolone during ethanol withdrawal in female Withdrawal Seizure-Prone vs. Withdrawal Seizure-Resistant mice. *Neuropharmacology* 54(2): 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm>
36. Umeoka EH, Garcia SB, Antunes-Rodrigues J, Elias LL, Garcia-Cairasco N (2011) Functional characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. *Brain Res* 4; 1381: 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.042>
37. Valentim-Lima E, de Oliveira JAC, Antunes-Rodrigues J, Reis LC, Garcia-Cairasco N, Mecawi AS (2021) Neuroendocrine changes in the hypothalamic-neurohypophysial system in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain submitted to audiogenic kindling. *J Neuroendocrinol* 33(7): e12975. <https://doi.org/10.1111/jne.12975>
38. Семиохина АФ, Федотова ИБ, Поletaева ИИ (2006) Крысы линии Крушинского–Молодковой: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения. *Журн высш нервн деят* 56(2): 249–267. [Semiokhina AF, Fedotova IB, Poletaeva II (2006) Rats of Krushinsky–Molodkina strain: studies of audiogenic epilepsy, vascular pathology, and behavior. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 56(3): 298–316. (In Russ)].
39. Федотова ИБ, Костына ЗА, Сурина НМ (2012) Селекция лабораторных крыс на признак “отсутствие предрасположенности к аудиогенным судорогам”. *Генетика* 48(6): 685–691. [Fedotova IB, Kostyna ZA, Surina NM (2012) Laboratory rat selection for the trait “the absence of audiogenic seizure proneness”. *Genetika* 48(6): 685–691. (In Russ)].
40. Федотова ИБ, Сурина НМ, Маликова ЛА, Раевский КС, Поletaева ИИ (2008) Исследования изменений мышечного тонуса (каталепсии), наступающих у крыс после аудиогенного судорожного припадка. *Журн высш нервн деят* 58(5): 620–627. [Fedotova IB, Surina NM, Malikova LA, Raevski? KS, Poletaeva II (2008) The investigation of cataleptic muscle tonus changes in rats after audiogenic seizures. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 58(5): 620–627. (In Russ)].

41. Kulikov AV, Bazovkina DV, Kondaurova EM, Popova NK (2008) Genetic structure of hereditary catalepsy in mice. *Genes Brain Behav* 7(4): 506–512. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00387.x>
42. Федотова ИБ, Поликарпова АВ, Перепелкина ОВ, Николаев ГМ, Смирнова ОВ (2018) Уровень кортикостерона в крови у крыс с разным уровнем предрасположенности к аудиогенной эпилепсии. *Патогенез* 16(3): 64–67. [Fedotova IB, Polikarpova AV, Perepelkina OV, Nikolaev GM, Smirnova OB, Poletaeva II (2018) The plasma corticosterone levels in in rats with different audiogenic epilepsy proneness. *Pathogenesis* 16(3): 64–67. (In Russ)].
43. Uddin MN, Siddiq A, Oettinger CW, D'Souza MJ (2011) Potentiation of pro-inflammatory cytokine suppression and survival by microencapsulated dexamethasone in the treatment of experimental sepsis. *J Drug Target* 19(9): 752–760. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.561856>
44. Müller-Guzzo GEF, Rodrigues LK, Regla VR, Simon CA (2018) Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model. *J Neuroimmunol* 325: 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.10.005>
45. Garcia-Curran MM, Hall AM, Patterson KP, Shao M, Eltom N, Chen K, Dubé CM, Baram TZ (2019) Dexamethasone attenuates hyperexcitability provoked by experimental febrile status epilepticus. *ENEURO* 15; 6(6): 0430-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0430-19.2019>
46. Vizuite AFK, Hansen F, Negri E, Leite MC, de Oliveira DL, Gonçalves CAJ (2018) Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis. *Neuroinflammation* 15(1): 68. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1109-5>
47. Forss M, Batcheller G, Skrtic S, Johannsson G (2012) Current practice of glucocorticoid replacement therapy and patient-perceived health outcomes in adrenal insufficiency – a worldwide patient survey. *BMC Endocr Disord* 12: 8. <https://doi.org/10.1186/1472-6823-12-8>
48. Chopde CT, Hote MS, Mandhane SN, Muthal AV (1995) Glucocorticoids attenuate haloperidol-induced catalepsy through adrenal catecholamines. *J Neural Transm Gen Sect* 102(1): 47–54. <https://doi.org/10.1007/BF01276564>
49. Capasso A, Di Giannuario A, Loizzo A, Pieretti S, Sorrentino L (1995) Dexamethasone reduces the behavioural effects induced by baclofen in mice. *J Pharm Pharmacol* 47(5): 425–430. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1995.tb05823.x>
50. Capasso A, Di Giannuario A, Loizzo A, Pieretti S, Sorrentino L (1996) Dexamethasone modifies the behavioral effects induced by clonidine in mice. *Pharmacology* 27(8): 1429–1434. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)02144-2](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)02144-2)
51. Фирстова ЮЮ, Абаимов ДА, Сурина НМ, Поletaева ИИ, Федотова ИБ, Ковалёв ГИ (2012) Связывание специфических лигандов D2- и NMDA-рецепторами клеток стриатума крыс двух линий, контрастных по предрасположенности к аудиогенной эпилепсии. *Бюл эксп биол мед* 154(8): 158–161. [Firstova JJ, Abaimov DA, Surina NM, Poletaeva II, Fedotova IB, Kovalev GI (2012) Binding of specific ligand by D2- and NMDA-receptors of striatum cells in two rat strains predisposed and resistant to audiogenic seizures. *Bull Exp Biol Med* 154(2): 196–198. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1007/s10517-012-1910-6>
52. Ozer H, Ekinci AC, Starr MS (1997) Dopamine D1- and D2-dependent catalepsy in the rat requires Dopamine D1- and D2-dependent catalepsy in the rat requires functional NMDA receptors in the corpus striatum, nucleus accumbens and substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* (1–2): 51–59. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00706-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00706-3)
53. Myslobodsky MS, Mintz M, Kofman O (1981) Pharmacologic analysis of the postictal immobility syndrome in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 15(1): 93–100. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(81\)90345-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(81)90345-2)

### The Effects of Acute and Chronic Infusions of Dexamethasone on Audiogenic Seizures and Catalepsy in Rats of Krushinsky–Molodkina and “0” Strains

N. M. Suruna<sup>a</sup>, \*, I. B. Fedotova<sup>a</sup>, and I. I. Poletaeva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University, Biology Department, Moscow, Russia

\*e-mail: Opera\_ghost@inbox.ru

Dexamethasone is a synthetic glucocorticosteroid with anti-inflammatory and immunosuppressive effects. In order to identify new targets for pharmacotherapy, as well as to study immune mechanisms in the pathogenesis of epilepsy, the influence of dexametha-

sone on audiogenic epilepsy and catalepsy in Krushinsky–Molodkina (KM) rats has been studied. The chronic (but not acute) infusion of dexamethasone decreased the audiogenic seizure fits intensity in male rats of Krushinsky–Molodkina (KM) strain which is highly susceptible to audiogenic epilepsy, but was accompanied by part of animal deaths. In a month after dexamethasone injections the audiogenic sensitivity of the rescued animals restored to the control levels. The “0” strain rats, bred from F2 KM × Wistar hybrids, no dexamethasone induced mortality was found. The acute and chronic dexamethasone action in rats of “0” strain induced the emergence of catalepsy after the sound exposure, although the audiogenic seizure was found only one animal. The chronic and acute dexamethasone decreased the postictal catalepsy in KM rats. Thus, pro-inflammatory mechanisms are involved in the pathogenesis of audiogenic epilepsy. Dexamethasone had a distinct anticonvulsant effect in the chronic experiment.

*Keywords:* audiogenic epilepsy, catalepsy, rat, Krushinsky–Molodkina strain, “0” strain, dexamethasone

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

АНАЛИЗ НЕЙРОГЕНЕЗА В ГИППОКАМПЕ МЫШЕЙ  
ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОМ ВЫВЕШИВАНИИ

© 2022 г. Е. А. Олейник<sup>1</sup>, А. А. Наумова<sup>1</sup>, Ю. С. Григорьева<sup>1</sup>, В. Т. Бахтеева<sup>1</sup>,  
Е. А. Лаврова<sup>1</sup>, Е. В. Черниговская<sup>1</sup>, М. В. Глазова<sup>1, \*</sup>

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

\*E-mail: mglazova@iefphb.ru

Поступила в редакцию 16.05.2022 г.

После доработки 24.06.2022 г.

Принята к публикации 24.06.2022 г.

Длительные космические полеты и симулируемая микрогравитация оказывают негативное влияние на целый ряд когнитивных функций, включая память, обучение, ориентацию в пространстве и принятие решений. В то же время известно, что в регуляции когнитивных процессов важную роль играет гиппокампальный нейрогенез. В настоящей работе было исследовано влияние 3-дневной двигательной разгрузки задних конечностей (антиортостатического вывешивания) на активность нейрогенеза в гиппокампе мышей. В экспериментах были использованы взрослые самцы мышей линии CD1. Наши результаты показали, что 3-дневное вывешивание не оказывает влияния на пролиферацию клеток и численность незрелых doublecortin-позитивных нейронов, однако вызывает снижение числа ранних nestin-позитивных нейрональных предшественников. Анализ сигнальных каскадов, вовлеченных в регуляцию гиппокампального нейрогенеза, не выявил изменений в активности протеинкиназ ERK1/2, однако показал повышение экспрессии и фосфорилирования транскрипционного фактора CREB. Кроме того, после 3-дневного вывешивания у мышей наблюдалось значительное увеличение концентрации кортикостерона в крови, а также экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гранулярных клетках и поле CA3 гиппокампа, что свидетельствует о развитии стрессорного ответа. Таким образом, стресс, отражающий адаптацию организма к двигательной разгрузке, может являться ключевым фактором, опосредующим нарушения гиппокампального нейрогенеза при кратковременном воздействии симулируемой микрогравитации.

*Ключевые слова:* антиортостатическое вывешивание, гиппокамп, нейрогенез, кортикостерон, глюкокортикоидные рецепторы, CREB

DOI: 10.31857/S0869813922070081

Впервые постнатальный нейрогенез у млекопитающих был открыт Altman и Das в 1965 г. [1]. В головном мозге взрослых млекопитающих выявлены две основные нейрогенные ниши: субгранулярная зона зубчатой извилины и субвентрикулярная зона боковых желудочков мозга. Десятилетия исследований показали, что гиппокампальный нейрогенез представляет собой гибкий процесс, который зависит от множества различных факторов [2]. В частности, физически активная жизнь и обогащенная среда стимулируют нейрогенез, что коррелирует с улучшением когнитивных функций [2]. И наоборот, произвольный малоподвижный образ жизни или гипокинезия, вызванная травмами или заболеваниями, могут негативно сказаться

как на нейрогенезе, так и на когнитивных функциях [3, 4]. В то же время молекулярные механизмы регуляции нейрогенеза при различных патологических состояниях до сих пор остаются малоизученными.

Было показано, что микрогравитация в условиях длительных космических миссий не только влияет на опорно-двигательный аппарат, сердечно-сосудистую и другие периферические системы, но и приводит к целому ряду нарушений в центральной нервной системе как у человека, так и у животных [5, 6]. МРТ-исследования выявили различные морфологические изменения в головном мозге астронавтов после длительного космического полета, в том числе изменение плотности и объема серого вещества, увеличение объема желудочков и снижение функциональных связей [6–8]. Сходные отклонения наблюдались у добровольцев в аналоговых экспериментах, позволяющих симулировать влияние микрогравитации на Земле, в первую очередь – в модели антиортостатической гипокинезии (АНОГ, или Head-down bed rest, HDBR) [7–10]. Кроме того, длительные космические полеты и АНОГ могут вызвать некоторые когнитивные изменения, такие как нарушения кратковременной памяти, переключения внимания, ориентации в пространстве и т.д. [11]. Очевидно, что выявленные патологии связаны с нарушением нейрохимических и молекулярных механизмов, которые были выявлены в экспериментах на животных. В частности, когнитивные нарушения могут быть связаны с нарушением работы гиппокампа, который участвует в обучении, формировании памяти и эмоций, пространственной ориентации, а также является нейрогенной зоной взрослого мозга. Сдвиг цереброспинальной жидкости и морфологические изменения, выявленные в коре, также указывают на изменения работы нейронов. Показано, что изменения окружающей среды и некоторые патологии, такие как эпилепсия и нейродегенеративные заболевания, могут существенно влиять на микроанатомию и функции гиппокампа [12–14]. В то же время данные о влиянии микрогравитации на гиппокамп пока ограничены. На данный момент опубликована только одна работа, в которой при помощи МРТ продемонстрировано уменьшение объема серого вещества в гиппокампе человека после 30-дневного воздействия АНОГ [15]. При этом полностью отсутствуют данные об уровне активности постнатального нейрогенеза во время или после космического полета. С другой стороны, в нескольких работах продемонстрировано негативное влияние длительной разгрузки задних конечностей на нейрогенез гиппокампа грызунов [16, 17]. Метод антиортостатической разгрузки задних конечностей (метод вывешивания по Новикову–Ильину в модификации Morey–Holton) является широко используемой моделью симулированной микрогравитации, воспроизводящей такие изменения, как снижение двигательной активности, атрофия мышц задних конечностей и сдвиг жидкости к голове [18, 19].

В регуляции постнатального нейрогенеза в гиппокампе взрослых млекопитающих задействован целый ряд сигнальных механизмов. Одним из основных регуляторов нейрональной дифференцировки являются протеинкиназы ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1, 2) [20]. Кроме того, было показано, что в регуляции дифференцировки нейронов гиппокампа участвует нейромедиатор глутамат [21, 22]. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что 3-дневное антиортостатическое вывешивание приводит к снижению глутаматергической нейротрансмиссии [23] и уменьшению числа незрелых doublecortin (DCX)-позитивных нейронов в гиппокампе крыс [24]. Эти изменения сопровождалось значительным снижением активности ERK1/2 киназ. В то же время известно, что скорость нейрогенеза у разных млекопитающих различается [25]. В частности, уровень пролиферации нейрональных стволовых клеток и скорость созревания нейронов в гиппокампе у крыс значительно выше, чем у мышей [26]. В данной работе мы провели исследование влияния 3-суточного вывешивания на уровень нейрогенеза в гиппокампе мы-

шей. Полученные данные показали, что в отличие от крыс у мышей кратковременное вывешивание не оказало значительного влияния на пролиферацию клеток и на популяцию DCX-позитивных незрелых нейронов в гиппокампе, но приводило к значительному снижению числа nestin-позитивных нейрональных прогениторных клеток. Эти изменения сопровождались повышением активности транскрипционного фактора CREB (cAMP responsive element binding protein), однако активность ERK1/2-киназ при этом не изменялась. При этом повышенное содержание кортикостерона в крови, а также повышенная экспрессия глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе, наблюдаемые после кратковременной двигательной разгрузки, свидетельствовали о развитии стрессорного ответа, который может являться ключевым фактором снижения нейрогенеза в условиях двигательной разгрузки.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Животные.* В экспериментах были использованы половозрелые самцы мышей линии CD1 в возрасте 4–5 мес. ( $n = 20$ ). Мышей содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к еде и воде. Все процедуры с использованием животных проводились в соответствии с Правилами обращения с лабораторными животными Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, согласующимися с директивой Европарламента 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г.

Животные были разделены на две группы: 1. Контроль ( $n = 10$ ); 2. Антиортостатическое вывешивание по методу Новикова–Ильина в модификации Morey–Holton (hindlimb unloading, HU;  $n = 10$ ). Каждое животное из группы HU помещали в индивидуальную клетку. Хвост животного прикрепляли с помощью пластыря к гибкому подвесу, который присоединяли через систему карабинов к горизонтальному металлическому стержню в верхней части клетки. Угол между телом животного и дном клетки составлял 30 градусов. Таким образом, задние конечности мыши не взаимодействовали с опорой и не участвовали в локомоции, однако животное могло свободно перемещаться по клетке с использованием передних конечностей. Животные контрольной группы помещались в такие же индивидуальные клетки, но не испытывали никаких ограничений локомоции. Длительность вывешивания составляла 3 суток. Все животные были выведены из эксперимента на следующий день.

По окончании эксперимента у всех животных брали кровь для дальнейшего иммуноферментного анализа концентрации кортикостерона. 5 животных из каждой экспериментальной группы были декапитированы, гиппокампы иссекали из мозга, гомогенизировали в лизирующем буфере (20 mM Tris, pH 7.5, 1% Triton-X100, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA), содержащем ингибиторы протеаз (Sigma-Aldrich, #P8340) и фосфатаз (Roche, #04906837001), и центрифугировали 15 мин при 12000 g при комнатной температуре. Полученный супернатант разводили в соотношении 1 : 2 трехкратным SDS буфером (0.2 M Tris-HCl, pH 6.7; 6% SDS; 15% глицерин; 0.003% бромфеноловый синий, 10%  $\beta$ -меркаптоэтанол), инкубировали 10 мин при 96°C, замораживали и хранили при –20°C для дальнейшего Вестерн-блот анализа.

Остальных животных наркотизировали внутрибрюшинным введением смеси золетила и ксилазина (60 + 10 мг/кг; Virbac) и перфузировали транскардиально холодным 4%-ным параформальдегидом. Мозг извлекали и постфиксировали в 4%-ном параформальдегиде в течение 3 суток при 4°C, далее инкубировали в 20%-ном растворе сахарозы на фосфатно-солевом буфере, замораживали и хранили при –80°C для дальнейшего иммуногистохимического анализа.

*Имуноферментный анализ.* Содержание кортикостерона в сыворотке крови определяли с помощью коммерческого набора реактивов “Кортикостерон кры-

са/мышь-ИФА” (ООО “ХЕМА”, #K210R) в соответствии с инструкцией производителя.

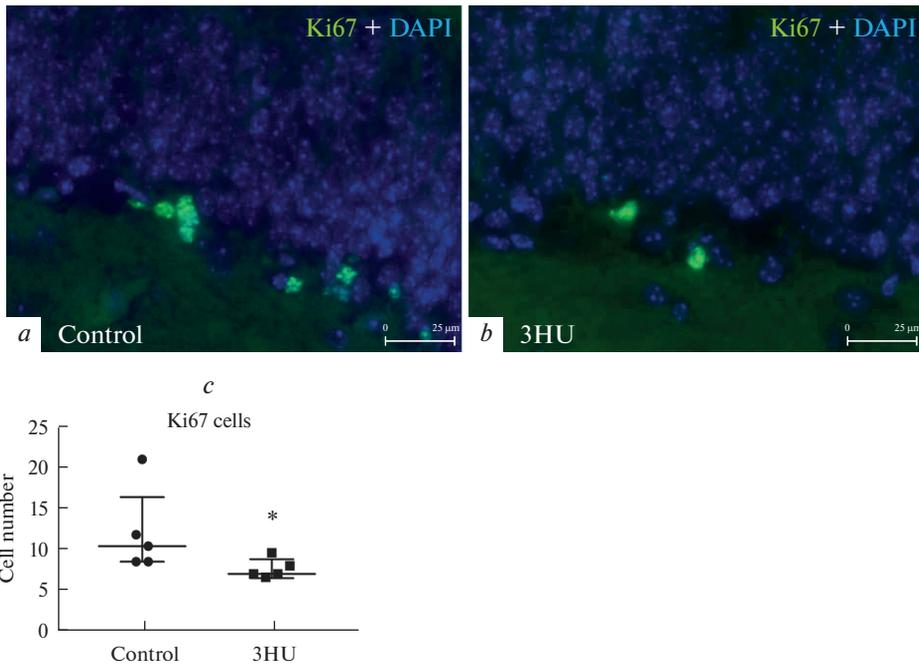
*Иммуногистохимический/иммунофлуоресцентный анализ.* Чередующиеся серии срезов мозга толщиной 10 мкм изготавливали на криостате Leica. Анализ каждого белка интереса проводился одновременно в контрольной и экспериментальной группах животных в стандартных условиях. После стандартной предварительной обработки гистологические срезы, содержащие дорсальный гиппокамп, инкубировали с первичными антителами против doublecortin (DCX) (1 : 300; Cell Signaling, #4604), Ki67 (1 : 300; Millipore, #AB9260), nestin (1 : 400; Cell Signaling, #4760), глюкокортикоидного рецептора (glucocorticoid receptor, GR) (1 : 400; Cell Signaling) и phospho-CREB (Ser133; 1 : 1000; Novus Biologicals, NB300-273) в течение ночи при комнатной температуре. Затем для иммунофлуоресцентного анализа экспрессии DCX, Ki67 и nestin препараты инкубировали в растворе вторичных антител, конъюгированных с Alexa488 (1 : 1000; Invitrogen, #913909) или Alexa568 (1 : 1000; Invitrogen, #762708) в течение часа при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали DAPI (1 : 2000; Sigma-Aldrich, #32670). Для иммуногистохимического анализа экспрессии GR и фосфо-CREB препараты инкубировали в растворе биотинилированных вторичных антител против иммуноглобулинов кролика (1 : 300, Vector Laboratories Inc., #BA-1000) в течение часа, а затем — в течение часа в растворе стрептавидин-пероксидазы (1 : 500; Supelco, #S2438). Выявление специфической реакции проводили в буферном растворе, содержащем 0.05% 3,3'-диаминобензидина (DAB; Sigma-Aldrich, #D5637) и 0.3% пероксида водорода. Флуоресцентную реакцию анализировали с помощью микроскопа Leica DMI 6000B fluorescent microscope (Leica Microsystems GmbH), световую — с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager A1 fluorescent microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Полученные микрофотографии обрабатывали в программе ImageJ. Далее подсчитывали число DCX, Ki67 и nestin-позитивных клеток, а также оценивали оптическую плотность pCREB и GR иммунопозитивного вещества в гиппокампе мышей.

*Вестерн-блоттинг.* Белки в пробах разделяли в 10%-ном полиакриамидном геле (SDS-PAGE) по Лэммли и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa-Cruz, #sc-3718). Мембраны инкубировали в 5%-ном обезжиренном молоке в течение часа, а затем — в растворе первичных антител против phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; 1 : 1000; Cell Signaling, #4376), CREB (1 : 1000; Cell Signaling, #9197) и actin (1 : 1000; Abcam, #ab3280) при 4°C в течение ночи. Затем мембраны отмывали в TBST и инкубировали в течение часа в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, против иммуноглобулинов кролика (1 : 10000; Sigma-Aldrich, #A0545) или мыши (1 : 40000; Sigma-Aldrich, #A9044). Результаты визуализировали с помощью SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, #34075) с использованием ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc.). Денситометрический анализ проводили с помощью программы ImageJ. Уровень экспрессии специфических белков нормировали с помощью сигнала actin, выявляемого для оценки общего содержания белка в пробах.

*Статистический анализ.* Полученные результаты статистически обрабатывали при помощи непараметрического U-критерия Манна—Уитни в коммерческой программе GraphPad Prism 7. Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильное отклонение. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Анализ показателей нейрогенеза.* В первую очередь мы оценили уровень пролиферативной активности в зубчатой извилине мышей. Полученные результаты показали, что после 3-суточного вывешивания число Ki67-позитивных клеток досто-



**Рис. 1.** Анализ уровня пролиферации в зубчатой извилине. *a, b* – Иммунофлуоресцентное выявление Ki67 у контрольных мышей (*a*) и после 3-дневного вывешивания (ЗНУ) (*b*). *c* – На графике представлено число Ki67 позитивных клеток у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (ЗНУ). Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильное отклонение. \*  $p < 0.05$ .

верно снизилось (рис. 1), что свидетельствует об ингибирующем влиянии краткосрочного вывешивания на активность пролиферации нейрональных стволовых клеток.

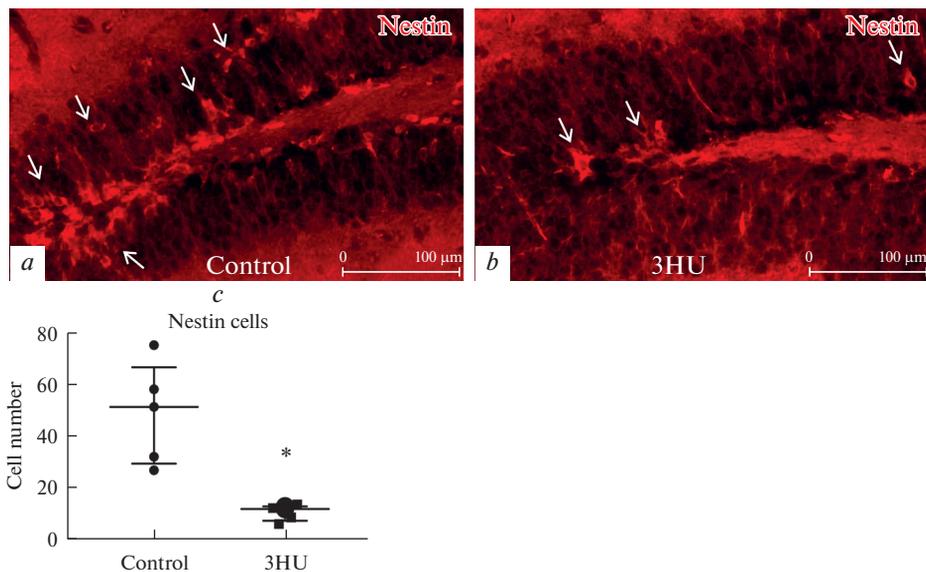
В то же время число nestin-позитивных нейрональных прогениторных клеток в зубчатой извилине у мышей после 3-суточного вывешивания также был значительно снижен по сравнению с контролем (рис. 2).

Анализ популяции незрелых DCX-позитивных нейронов также не выявил различий между экспериментальной и контрольной группами (рис. 3).

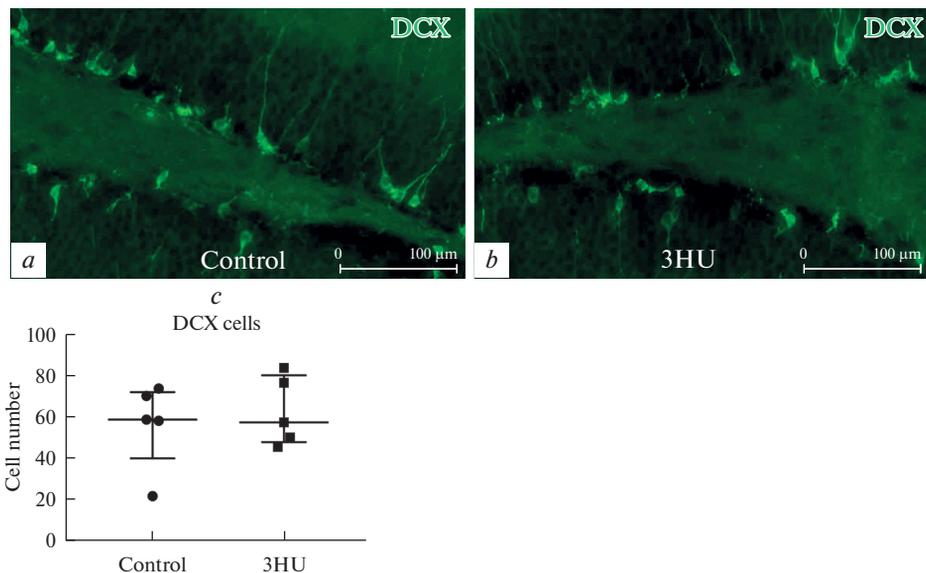
*Анализ активности протеинкиназ ERK1/2.* ERK1/2 играют важную роль в регуляции нейрональной дифференцировки [20], при этом уровень их фосфорилирования по остаткам Thr202/Tyr204 напрямую свидетельствует об уровне киназной активности. Полученные данные показали, что 3-суточное вывешивание не оказывало влияния на активность ERK1/2 (рис. 4).

*Анализ активности транскрипционного фактора CREB.* Транскрипционный фактор CREB контролирует экспрессию множества генов, участвующих в регуляции нейрогенеза [27], нейроадаптивных процессов, таких как обучение и память [28], а также опосредует эффекты стресса [29]. Иммуногистохимическое выявление активной формы CREB, фосфорилированной по Ser133, показал, что в результате вывешивания активность CREB значительно повысилась в гранулярном слое зубчатой извилины и зоне СА3 (рис. 5).

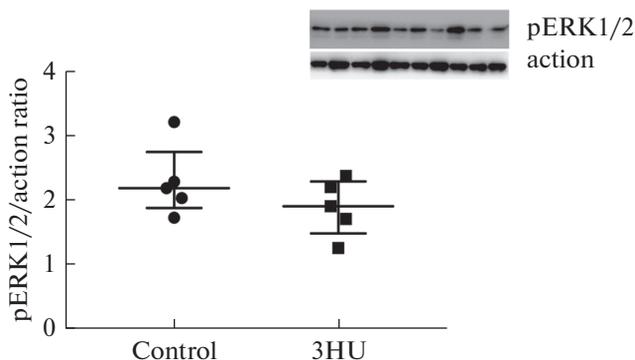
*Анализ содержания кортикостерона в крови.* Снижение нейрональной дифференцировки и повышение активности CREB в гиппокампе может быть связано не



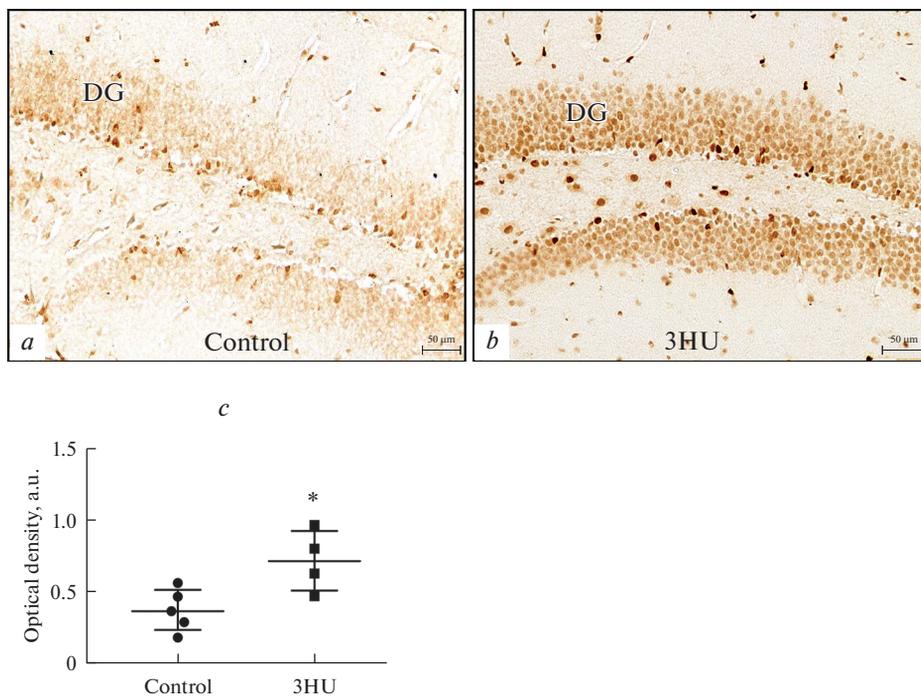
**Рис. 2.** Анализ популяции nestin-позитивных клеток. *a, b* – Иммунофлуоресцентное выявление nestin у контрольных мышей (*a*) и после 3-дневного вывешивания (ЗНУ) (*b*). *c* – На графике представлено число nestin-позитивных клеток у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (ЗНУ). Данные представлены в виде медианы ± интерквартильное отклонение. \* –  $p < 0.05$ .



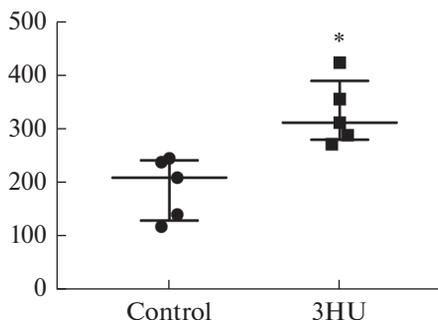
**Рис. 3.** Анализ популяции DCX-позитивных клеток в зубчатой извилине. *a, b* – Иммунофлуоресцентное выявление DCX у контрольных мышей (*a*) и после 3-дневного вывешивания (ЗНУ) (*b*). *c* – На графике представлено число DCX-позитивных клеток у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (ЗНУ). Данные представлены в виде медианы ± интерквартильное отклонение.



**Рис. 4.** Анализ уровня активности ERK1/2 в гиппокампе мышей. Уровень активности протеинкиназы ERK1/2 оценивали Вестерн-блоттингом по отношению уровня фосфорилированной формы ERK1/2 (pERK1/2) к уровню actin у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (ЗНУ). Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильное отклонение.



**Рис. 5.** Анализ pCREB в зубчатой извилине мышей. *a, b* – Иммуногистохимическое выявление pCREB у контрольных мышей (*a*) и после 3-х дневного вывешивания (ЗНУ) (*b*). *c* – На графике представлена оптическая плотность pCREB-иммунопозитивного вещества, выраженная в условных единицах (a.u.) у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (ЗНУ). Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильное отклонение. \* –  $p < 0.05$ .



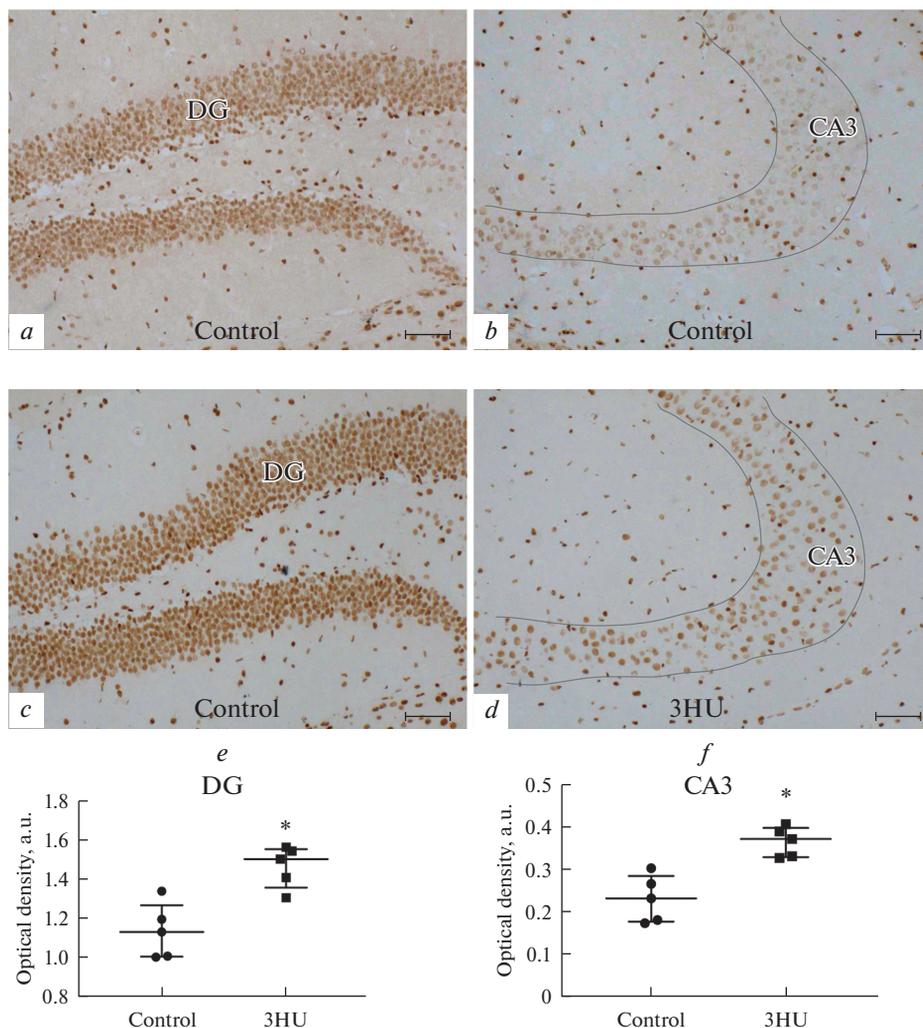
**Рис. 6.** Анализ содержания кортикостерона в крови мышей. Концентрация кортикостерона в крови мышей определяли иммуноферментным анализом. На графике представлены данные содержания кортикостерона (нг/мл) у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (ЗНУ). Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильное отклонение. \* $p < 0.05$ .

только с антиортостатическим вывешиванием, но и со стрессом, вызванным данным экспериментальным воздействием. Действительно, концентрация кортикостерона в сыворотке крови мышей после 3 суток вывешивания была значительно выше, чем у контрольных животных (рис. 6).

*Анализ экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (GR).* Известно, что при развитии стресса экспрессия GR значительно повышается в гранулярных клетках, а также GR начинает экспрессироваться в пирамидных клетках СА3, где в норме он не экспрессируется [30]. Наши данные показали значительное повышение экспрессии GR у мышей после 3-суточного вывешивания как в гранулярном слое зубчатой извилины (рис. 7a, c, e), так и в зоне СА3 гиппокампа (рис. 7b, d, f).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гиппокампальный нейрогенез у взрослых млекопитающих представляет собой сложный процесс, который начинается с пролиферации стволовых клеток и включает в себя несколько стадий дифференцировки, если выживают ранние постмитотические нейрональные предшественники [2]. Ранее в нескольких работах было показано, что длительная антиортостатическая разгрузка приводит к ингибированию нейрогенеза в гиппокампе [16, 17]. Однако нет каких-либо данных, показывающих, что при вывешивании нарушается в первую очередь: пролиферация, дифференцировка или и то, и другое. Наши данные выявили снижение количества nestin-позитивных клеток в зубчатой извилине без каких-либо изменений количества Ki67-позитивных пролиферирующих клеток и DCX-позитивных незрелых нейронов после 3-дневного вывешивания. Nestin относится к белкам промежуточных филаментов и выявляется в клетках на более ранних этапах нейрональной дифференцировки, чем DCX. Хотя первоначально этот белок был выявлен именно в нейрональных стволовых и прогениторных клетках, на сегодняшний день показано, что nestin экспрессируется также в миоцитах, сателлитных клетках скелетных мышц, поджелудочной железе, сердце, волосяных фолликулах и пр. [31]. В условиях *in vitro* большинство эмбриональных нейрональных стволовых клеток коэкспрессируют nestin и Ki67 [32]. Однако в гиппокампе взрослых мышей только около 20% nestin-позитивных клеток активно пролиферируют, о чем свидетельствует экспрессия в них Ki67 [33]. Наши данные также демонстрируют, что не все nestin-позитивные клетки являются пролиферирующими: в отличие от Ki67-позитивных



**Рис. 7.** Анализ экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (GR) в гиппокампе мышей. *a–d* – Иммуногистохимическое выявление GR у контрольных мышей в зубчатой извилине (*a*) и зоне CA3 (*b*), и у мышей после 3-суточного вывешивания (3HU) в зубчатой извилине (*c*) и CA3 (*d*). Шкала – 50 мкм. *e, f* – На графиках представлена оптическая плотность GR-иммунопозитивного вещества, выраженная в условных единицах (a.u.) у контрольных животных (control) и в группе вывешивания (3HU) в зубчатой извилине (*e*) и зоне CA3 (*f*). Данные представлены в виде медианы  $\pm$  интерквартильное отклонение. \* –  $p < 0.05$ .

тивных клеток, которые выявляются только в субгранулярной зоне зубчатой извилины, nestin-позитивные клетки выявлялись также в гранулярном слое.

Ранее нами было показано, что у крыс 3-дневная разгрузка задних конечностей также не приводит к изменению числа пролиферирующих клеток в гиппокампе, однако вызывает снижение популяции DCX-позитивных незрелых нейронов [24]. При этом после более длительного вывешивания (14 дней) у крыс значительно снижается не только численность DCX-позитивных незрелых нейронов, но и уровень пролиферации [16]. Выявленное несовпадение результатов у крыс и у мышей

можно объяснить данными о том, что скорость нейрогенеза у крыс значительно выше, и маркеры ранних стадий нейрональной дифференцировки, DCX и PSA-NCAM (polysialylated-neural cell adhesion molecule), в клетках, закончивших цикл деления, начинают экспрессироваться гораздо раньше [26].

Одним из основных регуляторов нейрональной дифференцировки являются протеинкиназы ERK1/2. Интересно, что вызванное двигательной разгрузкой снижение числа DCX-позитивных нейронов у крыс коррелирует со снижением активности протеинкиназ ERK1/2 [24]. В то же время в настоящей работе показано, что у мышей, которые демонстрируют отсутствие изменений в популяции DCX-позитивных клеток, не наблюдается изменений уровня фосфорилирования ERK1/2 по сравнению с контролем. Таким образом, у мышей при кратковременном вывешивании страдают более ранние нейрональные предшественники, а у крыс – более зрелые, однако можно заключить, что ранние этапы нейрональной дифференцировки являются главным уязвимым звеном при нарушениях регуляции нейрогенеза, вызванных кратковременной двигательной разгрузкой.

Наблюдаемые изменения гиппокампального нейрогенеза могут быть обусловлены стрессом, возникающим на коротких сроках вывешивания и отражающим адаптацию организма к гипокинезии, перераспределению мышечного тонуса, сдвигу жидкости и потере опорной афферентации. Ранее было установлено, что стресс может приводить к подавлению постнатального нейрогенеза в гиппокампе [34]. Одним из ключевых показателей стрессорного ответа у мышей и крыс является содержание кортикостерона в крови [35]. Имеющиеся сведения об изменениях уровня кортикостерона при антиортостатическом вывешивании противоречивы: по одним данным, повышение наблюдается в первый день эксперимента, а затем происходит стабилизация, по другим – повышенное содержание кортикостерона нормализуется только к седьмому дню [19]. В данном исследовании мы выявили повышенный уровень кортикостерона в крови мышей после 3-дневного вывешивания. Более того, результаты показали повышение экспрессии GR в гранулярном слое зубчатой извилины и зоне СА3 гиппокампа мышей. Эти данные также свидетельствуют о развитии стрессорного ответа, поскольку ранее было установлено, что при стрессе экспрессия GR появляется в зоне СА3, где он в норме не экспрессируется и значительно повышается в гранулярных клетках [30].

Мы также показали, что 3-дневное вывешивание приводит к значительному увеличению экспрессии и активности транскрипционного фактора CREB в гиппокампе мышей. Ранее сходные изменения были выявлены нами и в гиппокампе крыс [23]. Показано, что активация CREB наблюдается как при остром, так и при хроническом стрессе [30]. Таким образом, выявленное нами повышение активности CREB в гиппокампе может служить еще одним показателем стресса, вызванного двигательной разгрузкой задних конечностей. Известно, что CREB контролирует экспрессию множества генов, в том числе играющих важную роль в регуляции нейрогенеза [36]. Показано, что активация CREB стимулирует пролиферацию и созревание клеток гиппокампа, а также способствует выживанию нейронов [27]. Наши исследования не выявили повышения активности CREB в субгранулярной зоне зубчатой извилины, однако активация CREB в гранулярных клетках и поле СА3 может служить компенсаторным механизмом, повышающим выживаемость новообразованных клеток на фоне нарушений нейрогенеза, вызванных антиортостатическим вывешиванием.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что кратковременная двигательная разгрузка задних конечностей вызывает у мышей стрессорный ответ, который, по-видимому, является одной из основных причин снижения гиппокампального нейрогенеза.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была профинансирована за счет гранта РФФИ № 20-015-00062 и государственного задания № 075-0152-22-00.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Часть работы была выполнена на оборудовании ЦКП ИЭФБ РАН (441590).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А.О. — проведение анализа Вестерн-блот, иммуногистохимия, иммунофлуоресценция, А.А.Н. — планирование экспериментов, обсуждение результатов, Ю.С.Г. — проведение экспериментов, сбор материала, проведение анализа Вестерн-блот; В.Т.Б. — обработка данных, редактирование рукописи; Е.А.Л. — обеспечение экспериментальной базы; Е.В.Ч. — обсуждение результатов, интерпретация данных; М.В.Г. — постановка задачи, планирование экспериментов, написание статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Altman J, Das GD* (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319–335.  
<https://doi.org/10.1002/CNE.901240303>
2. *Baptista P, Andrade JP* (2018) Adult hippocampal neurogenesis: Regulation and possible functional and clinical correlates. *Front Neuroanat* 12: 44.
3. *Adami R, Pagano J, Colombo M, Platonova N, Recchia D, Chiamonte R, Bottinelli R, Cannepari M, Bottai D* (2018) Reduction of Movement in Neurological Diseases: Effects on Neural Stem Cells Characteristics. *Front Neurosci* 12: 336.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00336>
4. *Watson N, Ji X, Yasuhara T, Date I, Kaneko Y, Tajiri N, Borlongan C* (2015) No pain, No gain: Lack of exercise obstructs neurogenesis. *Cell Transplant* 24: 591–597.  
<https://doi.org/10.3727/096368915X687723>
5. *Popova NK, Kulikov AV, Naumenko VS* (2020) Spaceflight and brain plasticity: Spaceflight effects on regional expression of neurotransmitter systems and neurotrophic factors encoding genes. *Neurosci Biobehav Rev* 119: 396–405.
6. *Roberts DR, Albrecht MH, Collins HR, Asemani D, Spampinato VM, Xun Zhu, Chimowitz MI, Antonucci MU* (2017) Effects of Spaceflight on Astronaut Brain Structure as Indicated on MRI. *N Engl J Med* 377: 1746–1753.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1705129>
7. *Demertzi A, Van Ombergen A, Tomilovskaya E, Jeurissen B, Pechenkova E, Perri CD, Litvinova L, Amico E, Rumshiskaya A, Rukavishnikov I, Sijbers J, Sinitsyn V, Kozlovskaya I, Sunaert S, Parizel PM, Van de Heyning PH, Laureys S, Wuyts FL* (2016) Cortical reorganization in an astronaut's brain after long-duration spaceflight. *Brain Struct Funct* 221: 2873–2876.  
<https://doi.org/10.1007/S00429-015-1054-3/FIGURES/1>
8. *Van Ombergen A, Demertzi A, Tomilovskaya E, Jeurissen B, Sijbers J, Kozlovskaya I, Parizel PM, Van de Heyning PH, Sunaert S, Laureys S, Wuyts FL* (2017) The effect of spaceflight and microgravity on the human brain. *J Neurol* 264: 18–22.  
<https://doi.org/10.1007/S00415-017-8427-X>
9. *Koppelmans V, Bloomberg JJ, De Dios YE, Wood SJ, Reuter-Lorenz PA, Kofman IS, Riascos R, Mulavara AP, Seidler RD* (2017) Brain plasticity and sensorimotor deterioration as a function of 70 days head down tilt bed rest. *PLoS One* 12: e0182236.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0182236>
10. *Roberts DR, Zhu X, Tabesh A, Duffy EW, Ramsey DA, Brown TR* (2015) Structural Brain Changes following Long-Term 6° Head-Down Tilt Bed Rest as an Analog for Spaceflight. *Am J Neuroradiol* 36: 2048–2054.  
<https://doi.org/10.3174/AJNR.A4406>
11. *Casler JG, Cook JR* (1999) Cognitive performance in space and analogous environments. *Int J Cogn Ergon* 3: 351–372.

12. Vecchio LM, Meng Y, Xhima K, Lipsman N, Hamani C, Aubert I (2018) The Neuroprotective Effects of Exercise: Maintaining a Healthy Brain Throughout Aging. *Brain Plast* 4: 17. <https://doi.org/10.3233/BPL-180069>
13. Dekeyser S, De Kock I, Nikoubashman O, Bossche SV, Eetvelde RV, De Groote JM, Wiesmann M, Deblaere K, Achten E (2017) “Unforgettable” – a pictorial essay on anatomy and pathology of the hippocampus. *Insights Imaging* 8: 199. <https://doi.org/10.1007/S13244-016-0541-2>
14. Anand K, Dhikav V (2012) Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol* 15: 239–246.
15. Li K, Guo X, Jin Z, Ouyang X, Zeng Y, Jinsheng F, Wang Y, Yao L, Ma L (2015) Effect of Simulated Microgravity on Human Brain Gray Matter and White Matter – Evidence from MRI. *PLoS One* 10: e0135835. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0135835>
16. Yasuhara T, Hara K, Maki M, Matsukawa N, Fujino H, Date I, Borlongan CV (2007) Lack of exercise, via hindlimb suspension, impedes endogenous neurogenesis. *Neuroscience* 149: 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.045>
17. Nomura S, Kami K, Kawano F, Oke Y, Nakai N, Ohira T, Fujita R, Terada M, Imaizumi K, Ohira Y (2012) Effects of hindlimb unloading on neurogenesis in the hippocampus of newly weaned rats. *Neurosci Lett* 509: 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.12.022>
18. Qaisar R, Karim A, Elmoselhi AB (2020) Muscle unloading: A comparison between spaceflight and ground-based models. *Acta Physiol* 228: e13431. <https://doi.org/10.1111/apha.13431>
19. Morey-Holton ER, Globus RK (2002) Hindlimb unloading rodent model: Technical aspects. *J Appl Physiol* 92: 1367–1377.
20. Li Z, Theus MH, Wei L (2006) Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* 48: 513–523. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2006.00889.x>
21. Jansson LC, Åkerman KE (2014) The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. *J Neural Transm* 121: 819–836. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1174-6>
22. Schlett K (2006) Glutamate as a Modulator of Embryonic and Adult Neurogenesis. *Curr Top Med Chem* 6: 949–960. <https://doi.org/10.2174/156802606777323665>
23. Berezovskaya AS, Tyganov SA, Nikolaeva SD, Naumova AA, Merkulyeva NS, Shenkman BS, Glazova MV (2021) Dynamic Foot Stimulations During Short-Term Hindlimb Unloading Prevent Dysregulation of the Neurotransmission in the Hippocampus of Rats. *Cell Mol Neurobiol* 41: 1549–1561. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00922-2>
24. Berezovskaya AS, Tyganov SA, Nikolaeva SD, Naumova AA, Shenkman BS, Glazova MV (2021) Plantar stimulations during 3-day hindlimb unloading prevent loss of neural progenitors and maintain erk1/2 activity in the rat hippocampus. *Life* 11(5) : 449. <https://doi.org/10.3390/life11050449>
25. Charvet CJ, Finlay BL (2018) Comparing adult hippocampal neurogenesis across species: Translating time to predict the tempo in humans. *Front Neurosci* 12. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00706/FULL>
26. Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Heather A, Cameron HA (2009) Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice. *J Neurosci* 29: 14484–14495. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009>
27. Ortega-Martínez S (2015) A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Front Mol Neurosci* 8: 46. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2015.00046/BIBTEX>
28. Bourchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioff D, Schutz G, Silva AG (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79: 59–68. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90400-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90400-6)
29. Böer U, Alejel T, Beimesche S, Cierny I, Krause D, Knepel W, Flügge G (2007) CRE/CREB-Driven Up-Regulation of Gene Expression by Chronic Social Stress in CRE-Luciferase Transgenic Mice: Reversal by Antidepressant Treatment. *PLoS One* 2: e431. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000431>
30. Chen Y, Fenoglio KA, Dubé CM, Chen Y, Fenoglio KA, Dubé CM (2006) Cellular and molecular mechanisms of hippocampal activation by acute stress are age-dependent. *Mol Psychiatry* 11: 992. <https://doi.org/10.1038/SJ.MP.4001863>

31. *Bernal A, Arranz L* (2018) Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci* 75: 2177.  
<https://doi.org/10.1007/S00018-018-2794-Z>
32. *Marei HES, Ahmed AE, Michetti F, Pescatori M, Pallini R, Casalbone P, Cenciarelli C, Elhadidy M* (2012) Gene Expression Profile of Adult Human Olfactory Bulb and Embryonic Neural Stem Cell Suggests Distinct Signaling Pathways and Epigenetic Control. *PLoS One* 7: e33542.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0033542>
33. *Pechnick RN, Zonis S, Wawrowsky K, Cosgayon R, Farrokhi C, Lacayo L, Chesnokova V* (2011) Antidepressants Stimulate Hippocampal Neurogenesis by Inhibiting p21 Expression in the Subgranular Zone of the Hippocampus. *PLoS One* 6: e27290.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0027290>
34. *Warner-Schmidt JL, Duman RS* (2006) Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16: 239–249.  
<https://doi.org/10.1002/HIPO.20156>
35. *Boucher P, Plusquellec P* (2019) Acute Stress Assessment From Excess Cortisol Secretion: Fundamentals and Perspectives. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 749.  
<https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00749/BIBTEX>
36. *Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K* (2011) CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem* 116: 1.  
<https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2010.07080.X>

### Analysis of Neurogenesis in the Hippocampus of Mice Exposed to Short-Term Hindlimb Unloading

**E. A. Oleynik<sup>a</sup>, A. A. Naumova<sup>a</sup>, Y. S. Grigorieva<sup>a</sup>, V. T. Bakhteeva<sup>a</sup>, E. A. Lavrova<sup>a</sup>,  
E. V. Chernigovskaya<sup>a</sup>, and M. V. Glazova<sup>a,\*</sup>**

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

<sup>\*</sup>*e-mail: mglazova@iephb.ru*

Long-term spaceflights and simulated microgravity negatively affect a number of cognitive functions including memory, learning, spatial orientation, and decision making. At the same time it was shown that cognitive processes are regulated by the hippocampal neurogenesis. In the present work we analyzed the effect of 3-day antiorthostatic (hindlimb) unloading on the activity of neurogenesis in the hippocampus of mice. Adult male CD1 mice were recruited in the experiments. Our results showed that 3-day unloading did not affect cell proliferation and population of immature doublecortin-positive neurons but induced the decrease in number of early nestin-positive neural progenitors. Analysis of signaling cascades involved in the regulation of the hippocampal neurogenesis showed no changes in the activity of ERK1/2, however, significant increase in expression and activity of transcriptional factor CREB was observed. In addition, mice exposed to 3-day unloading demonstrated elevated concentration of corticosterone in the blood serum and increased expression of glucocorticoid receptors in the granular cells and CA3 subfield of the hippocampus suggesting the development of stress response. Thus, stress associated with adaptation to the hindlimb unloading can be the crucial factor that mediates alterations in the hippocampal neurogenesis under short-term simulated microgravity.

**Keywords:** hindlimb unloading, hippocampus, neurogenesis, corticosterone, glucocorticoid receptors, CREB

**ПРИМЕНЕНИЕ НАИВНОГО БАЙЕСОВСКОГО КЛАССИФИКАТОРА  
ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ АНТИПСИХОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ  
НА ПАРАМЕТРЫ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС**

© 2022 г. Ю. И. Сысоев<sup>1, 2, 3, 4, \*</sup>, Д. Д. Шиц<sup>1</sup>, М. М. Пучик<sup>1</sup>, В. А. Приходько<sup>1, 4</sup>,  
Р. Д. Идиятуллин<sup>1</sup>, А. А. Котельникова<sup>1</sup>, С. В. Оковитый<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: susoyev92@mail.ru

Поступила в редакцию 23.05.2022 г.

После доработки 16.06.2022 г.

Принята к публикации 20.06.2022 г.

Поиск и разработка методов выявления эффектов антипсихотических средств является важной задачей медико-биологических исследований. Поведенческие тесты, наиболее часто применяемые для фармакологического скрининга, позволяют эффективно оценивать влияние препаратов на уровень тревожности и двигательной активности животных, однако выявить с их помощью антипсихотическое действие достаточно затруднительно. Перспективным подходом для решения данных задач может быть метод фармакоэлектроэнцефалографии (фармако-ЭЭГ), основанный на концепции специфических изменений биоэлектрической активности головного мозга под влиянием различных психотропных препаратов. С развитием методов машинного обучения возникают новые возможности использования данных фармако-ЭЭГ для решения задач классификации и прогнозирования. В настоящей работе предложен экспериментальный подход для выявления специфической активности и сравнения фармакологического профиля антипсихотических средств с использованием наивного байесовского классификатора – простого вероятностного классификатора, достаточно широко применяемого в биомедицинских исследованиях. Эксперименты были выполнены на белых беспородных крысах-самцах с хронически имплантированными электрокортикографическими электродами. Была сформирована библиотека электрокортикограмм (ЭКоГ) при введении антипсихотических средств: хлорпромазина, галоперидола, дроперидола, тиаприда и сульпирида, которая использовалась как обучающая выборка. Для каждой записи были рассчитаны значения параметров ЭКоГ до и после введения препаратов. Анализ ЭКоГ включал в себя расчет 132 показателей амплитудно-спектральных характеристик сигнала. Уменьшение размерности данных проводили с помощью метода главных компонент. Применение наивного байесовского классификатора позволило выявить специфическое влияние антипсихотических средств на параметры биоэлектрической активности головного мозга крыс, дифференцируя их от бензодиазепинового транквилизатора феназепам, обладающего седативной активностью. Кроме того, данный подход продемонстрировал эффективность сравнительной оценки ЭКоГ-особенностей изучаемых антипсихотических

средств между собой, а также с другими средствами, близкими по спектру рецепторного действия (например, трициклическим антидепрессантом амитриптилином). Таким образом, предлагаемый нами метод может быть использован как для отличия антипсихотического действия лекарственных препаратов от седативного, так и для сравнения эффектов антипсихотических средств между собой.

*Ключевые слова:* наивный байесовский классификатор, машинное обучение, фармакоэлектроэнцефалография, электрокортикография, антипсихотические средства

**DOI:** 10.31857/S0869813922070093

Антипсихотические средства – группа препаратов, широко применяемых в психотерапии, главным образом для лечения шизофрении и аффективных расстройств. С появлением новых представителей данной группы было показано, что многие из них дополнительно обладают положительными эффектами при биполярной (оланзапин, рисперидон, кветиапин) и униполярной депрессии (арипипразол, оланзапин и др.), а также при тревожных расстройствах (кветиапин) [1]. Принято считать, что основной фармакологической мишенью антипсихотических средств являются дофаминовые D<sub>2</sub>-рецепторы, однако современный подход к классификации предлагает выделять не менее 5 групп, в зависимости от механизмов действия [2], а фармакологическими мишенями могут быть не только дофаминовые рецепторы, но и другие медиаторные системы, в том числе серотонинергическая, глутаматергическая и система  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК), а также рецепторы следовых аминов (trace amine associated receptors, TAAR) и нейропептидов [3].

В связи с большим разнообразием молекулярных механизмов действия различных антипсихотических средств возникает необходимость в эффективных методах дифференцировки эффектов представителей данной группы на этапе экспериментальных исследований. Традиционно могут быть использованы батареи поведенческих тестов, позволяющих оценивать уровень тревожности и исследовательской активности мелких лабораторных животных (например, “Открытое поле”, “Приподнятый крестообразный лабиринт” и т.д.). Следующим этапом, как правило, являются эксперименты с использованием моделей психотических расстройств у мышей и крыс (разрушение вентральных областей гиппокампа, фармакологические и генетические модели) [4] и специфических поведенческих тестов (препульсивное ингибирование, трехкамерный социальный тест и др.) [5]. При проведении сразу нескольких поведенческих тестов можно получить комплексные данные об эффектах того или иного препарата на симптомы шизофрении у лабораторных животных. Тем не менее, такой подход может потребовать большого количества времени, материальных затрат и соблюдения достаточно строгих условий тестирования (последовательности тестов, промежутков между ними и т.д.). Кроме того, поведенческие тесты не всегда оказываются достаточно чувствительными для выявления эффектов психоактивных препаратов.

Перспективным подходом для выявления различий в эффектах антипсихотических средств может быть метод фармакоэнцефалографии (фармако-ЭЭГ). Несмотря на то, что первые подобные исследования проводили уже в 60–70-е года прошлого века [6, 7], этот экспериментальный подход так и не стал стандартом фармакологического скрининга новых психоактивных молекул. Во многом это было обусловлено комплексностью получаемых данных (большим количеством показателей, часто трудно интерпретируемых), в связи с чем исследователи не могли их использовать для сравнения профилей фармакологической активности изучаемых препаратов.

С появлением современных методов компьютерного анализа данных в настоящее время вновь возрос интерес к использованию фармако-ЭЭГ в биомедицинских исследованиях [8–11].

Особое внимание привлекает возможность использования методов машинного обучения с целью прогнозирования фармакологической активности того или иного препарата на основании данных об его эффектах на параметры биоэлектрической активности у лабораторных животных. В настоящее время такие подходы активно используются для направленного синтеза новых фармакологически активных соединений [12]. Несмотря на большое разнообразие методов машинного обучения, наивный байесовский классификатор (НБК), являясь одним из самых базовых, широко используется в медицинских и биомедицинских исследованиях. НБК — это простой вероятностный классификатор, в котором каждый параметр классифицируемых данных рассматривается независимо от других характеристик. Он находит широкое применение в медицинской практике, например, для предсказания резистентности пациентов с онкологическими заболеваниями к химиотерапии [13], диагностики сахарного диабета [14] или оценки риска лекарственного поражения печени [15]. Безусловно, возможности применения данного алгоритма не ограничиваются вышеуказанными примерами, и с каждым годом появляется все больше и больше работ, где авторы успешно используют данный подход в задачах классификации и прогнозирования [16].

На основании вышесказанного целью данной работы была оценка возможности использования НБК для выявления и различия эффектов антипсихотических лекарственных средств на параметры электрокортикограмм (ЭКоГ) у крыс.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили в соответствии с принципами Базельской декларации, Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и рекомендациями биоэтической комиссии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Эксперименты были выполнены на 33 крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г, полученных из ФГУП Питомник лабораторных животных “Рапполово” (Ленинградская область, Россия). Крыс содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде. Все опытные и контрольные животные были взяты из одной партии и прошли карантин в течение 14 суток.

Кортикографические электроды изготавливали из нихромовой проволоки диаметром 0.5 мм (для регистрирующих и референтного электродов) и диаметром 0.16 мм — для заземляющего электрода. Изоляцию осуществляли термоусадочной трубкой (1.5/0.5 мм); длина регистрирующей (неизолированной) части составляла  $\approx 1$  мм. Все электроды объединяли в гнездо на кабель BLS-8 (Connfly Electronic Co. Ltd., КНР) с шагом 2.54 мм.

Процедуры имплантации электродов и послеоперационного ухода за животными были подробно описаны в ранее опубликованной работе [17]. Для наркотизации животных использовали тилетамин/золазепам 50 (Золетил®, Virbac, Франция; 10 мг/кг, внутримышечно). Электроды FP1 и FP2 располагали в области первичной двигательной коры (AP = 0.0, ML = 2.5, DV = 1.0), C3 и C4 — первичной соматосенсорной коры над гиппокампом (AP = -4.0, ML = 2.5, DV = 1.0), O1 и O2 — вторичной зрительной коры (AP = -7.0, ML = 2.5, DV = 1.0). Референтный электрод устанавливали в носовую кость, заземляющий — под кожу в области шеи.

Запись ЭКоГ у животных осуществляли не ранее чем через 7 дней после операции с помощью 8-канального энцефалографа Нейрон-Спектр-1 (Нейрософт, Россия)

с полосой пропускания 0.5–35 Гц и частотой квантования 500 Гц. Регистрацию сигнала проводили одновременно с видеорегистрацией поведения в условиях домашней клетки при искусственном освещении. Длительность записи составляла 2 ч и включала в себя 30 мин фоновой активности (до введения препарата или физиологического раствора) и 1.5 ч после инъекции. Для дальнейшего анализа отбирали два 60-секундных участка записи: непосредственно перед введением и спустя 20 мин после. Во время выбранных фрагментов ЭКоГ животные находились в спокойном бодрствующем состоянии, в отсутствие локомоторной или исследовательской активности, а также груминга или скрэтчинга [18].

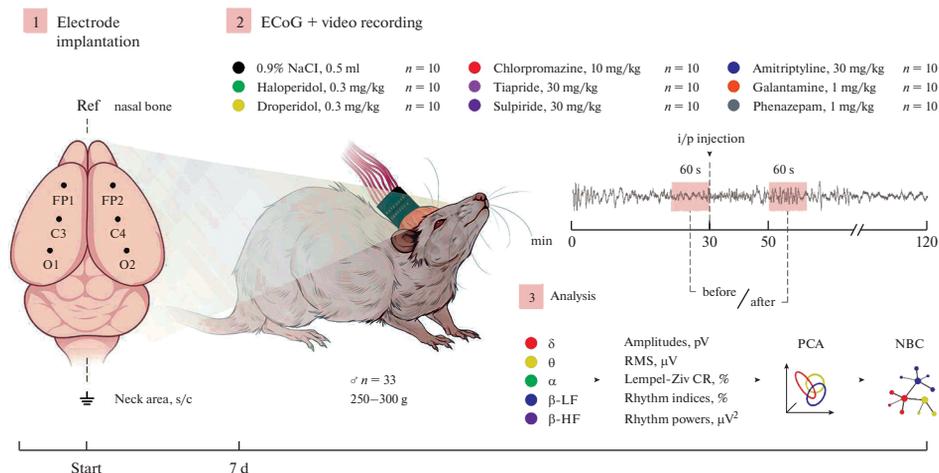
В качестве типичных антипсихотических средств нами были выбраны хлорпромазин, галоперидол и дроперидол, атипичных – тиаприд и сульпирид. Дополнительно в качестве референтных препаратов были сделаны записи ЭКоГ-эффектов трициклического антидепрессанта амитриптилина, ингибитора ацетилхолинэстеразы галантамина и бензодиазепинового транквилизатора феназепама. Выбор амитриптилина как препарата сравнения был обусловлен его действием на многие фармакологические мишени (М-холино-,  $H_1$ -гистаминовые и  $\alpha_1$ -адренорецепторы), являющиеся точками приложения действия хлорпромазина. Представляло интерес, насколько предлагаемый подход позволит обнаружить данное сходство.

Также известно, что типичные нейролептики могут вызывать экстрапирамидные нарушения за счет повышения тонуса холинергической иннервации в головном мозге [19]. В рамках настоящей работы было предположено, что метод фармако-ЭЭГ может быть чувствительным к ранним проявлениям данного побочного эффекта, и ввиду этого для хлорпромазина, галоперидола и дроперидола была ожидаема высокая вероятность сходства с галантамином как средством, повышающим тонус холинергической иннервации. Феназепам был выбран в качестве средства с выраженным седативным действием, влияние которого на параметры ЭКоГ должно отличаться от действия типичных и атипичных антипсихотических средств.

Испытуемые препараты вводили внутривенно, при необходимости предварительно растворив в физиологическом растворе до нужной концентрации. Доза галоперидола (ООО “Велфарм”, Россия) и дроперидола (ФГУП “Московский эндокринный завод”, Россия) была 0.3 мг/кг, хлорпромазина (АО “Валента Фарм”, Россия) – 10 мг/кг, амитриптилина (ФГУП “Московский эндокринный завод”, Россия), тиаприда (АО “Органика”, Россия) и сульпирида (АО “Органика”, Россия) – 30 мг/кг, галантамина (АО “Софарма”, Болгария) и феназепама (АО “Валента Фарм”, Россия) – 1 мг/кг [20–22]. В качестве контроля вводили физиологический раствор в объеме 0.5 мл.

Для каждого препарата было сделано не менее 10 записей у разных животных ( $n = 10$  для каждой группы). Введение нового препарата производили не ранее чем через 3 дня после предыдущей записи для исключения взаимодействия и остаточных эффектов. Частота тестирования той или иной крысы определялась сохранностью коннекторов и заземляющего электрода, а также общим состоянием животного. В случае признаков инфекционного заболевания вводили повторно бициллин-3 (ОАО “Синтез”, Россия; 5000 ЕД/кг, внутримышечно) и следующее тестирование проводили не ранее чем через неделю после инъекции.

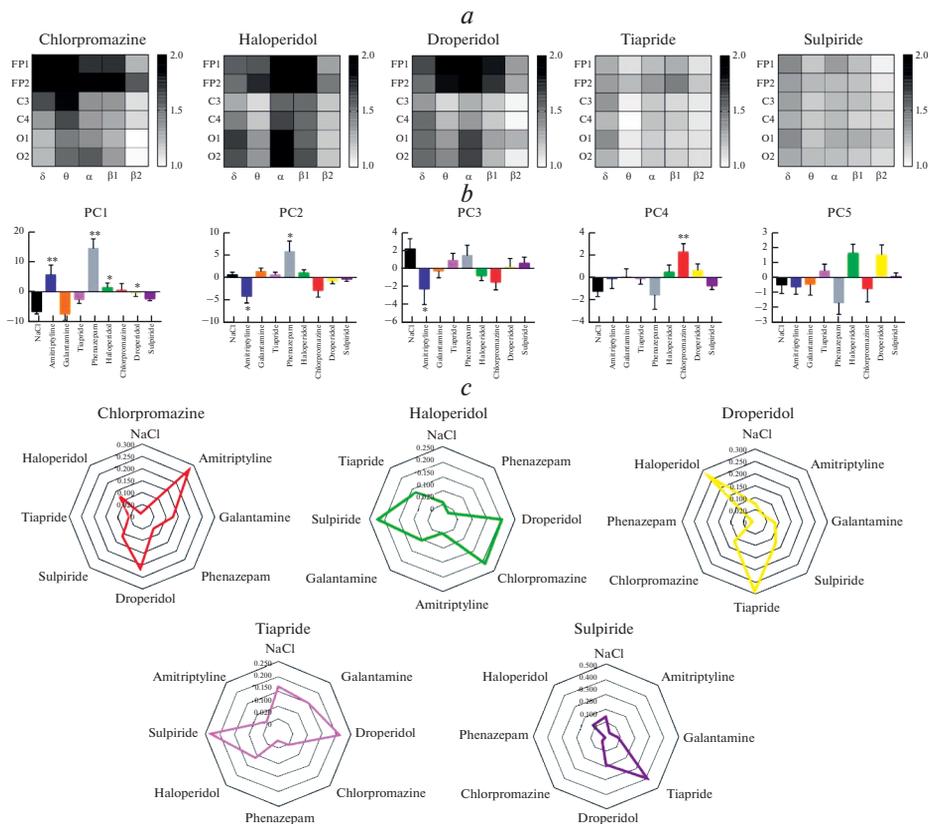
Анализ полученных записей осуществляли с помощью программы Нейрон-Спектр.NET $\omega$  (ООО “Нейрософт”, Россия). Для всех 6 отведений (FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2) проводили амплитудно-спектральный анализ с расчетом в общей сложности 132 параметров, включавших в себя среднюю и максимальную амплитуды сигнала, среднеквадратичное отклонение и степень сжатия по Лемпел–Зив, средние амплитуды ритмов волн, индексы и средние мощности ритмов. Из сигнала выделяли  $\delta$ - (0.5–4.0 Гц),  $\theta$ - (4.0–8.0 Гц),  $\alpha$ - (8.0–14.0 Гц) и  $\beta$ -ритмы (низкоча-



**Рис. 1.** Этапы эксперимента. (1) – Имплантация электрокортикографических электродов в области первичной двигательной коры (FP1 и FP2), первичной соматосенсорной коры над гиппокампом (C3 и C4) и вторичной зрительной коры (O1 и O2). (2) – Регистрация электрокортикограмм в условиях домашней клетки при одновременной видеорегистрации поведения. (3) – Анализ выбранных участков электрокортикограмм. Ref – референтный электрод, s/c – подкожно, i/p – внутривенно, ECoG – электрокортикограмма, RMS – среднеквадратичное отклонение, CR – степень сжатия, LF – низкочастотные, HF – высокочастотные, PCA – метод главных компонент, NBC – наивный байесовский классификатор.

стотные (НЧ) – 14.0–20.0 Гц – и высокочастотные (ВЧ) – 20.0–35.0 Гц). Данные выражали как соотношения значения параметров до введения препарата к значениям соответствующих параметров после введения (от 0 до 1) (рис. 1).

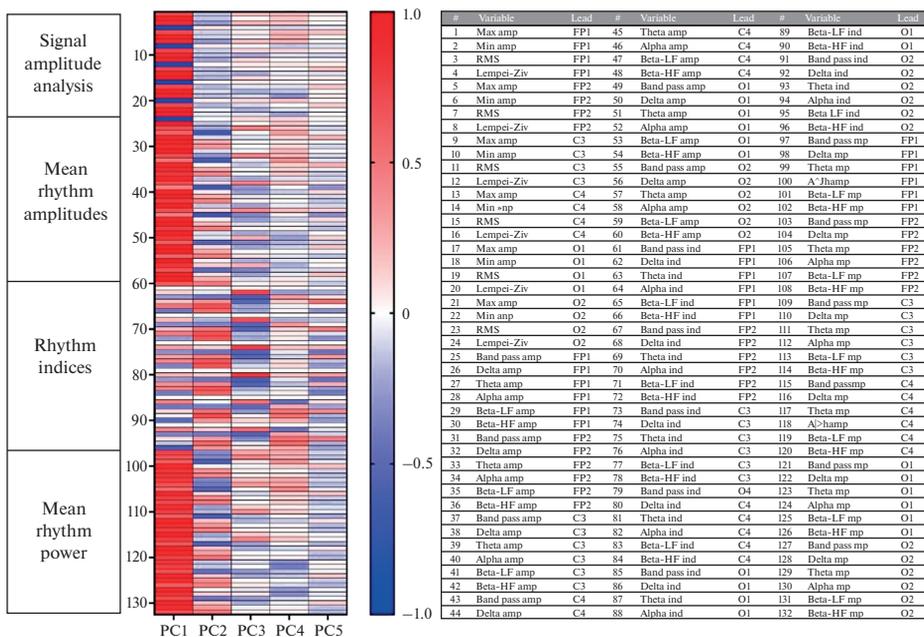
Обработку и последующий анализ полученных данных осуществляли с помощью надстройки для MS Excel XLSTAT 2016.02.28451. Уменьшение размерности данных проводили с помощью метода главных компонент (МГК) – технологии многомерного статистического анализа, используемой для сокращения размерности пространства признаков с минимальной потерей полезной информации. Суть метода состоит в ортогональном линейном преобразовании, которое отображает данные из исходного пространства признаков в новое пространство меньшей размерности. При этом первая ось новой системы координат строится таким образом, чтобы дисперсия данных вдоль нее была бы максимальной. Вторая ось строится ортогонально первой так, чтобы дисперсия данных вдоль нее была бы максимальной из оставшихся возможных и т.д. Первая ось называется первой главной компонентой, вторая – второй и т.д. [23]. На основании рассчитанных значений главных компонент для каждой записи из групп хлорпромазина, галоперидола, дроперидола, тиоприда и сульпирида с помощью НБК была спрогнозирована фармакологическая активность (рассчитано сходство с той или иной группой обучающей выборки). В качестве обучающей выборки были использованы данные всех полученных записей за исключением группы препарата, для которого осуществлялся прогноз. Числовые данные, приведенные на рисунках, представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM).



**Рис. 2.** Результаты анализа параметров электрокортикограмм. (а) – Тепловые карты усредненных ( $n = 10$  для каждой группы) значений средней мощности  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ритмов в отведениях FP1, FP2, C3, C4, O1 и O2 при введении хлорпромазина, галоперидола, дроперидола, тиаприда и сульпирида. Данные представлены как отношения значений средней мощности ритмов спустя 20 мин после введения препаратов к значениям соответствующих показателей до введения (30-я минута фоновой записи). (б) – Усредненные значения пяти главных компонент во всех экспериментальных группах. (с) – Лепестковые диаграммы усредненных значений вероятности сходства фармакологической активности хлорпромазина, галоперидола, дроперидола, тиаприда и сульпирида с препаратами из обучающей выборки, полученные с использованием наивного байесовского классификатора.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Введение антипсихотических средств крысам вызывало у них изменение амплитудно-спектральных характеристик ЭКОГ (рис. 2а). Наиболее выраженные эффекты были отмечены для хлорпромазина, галоперидола и дроперидола. При введении хлорпромазина наблюдалось увеличение средней мощности  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -НЧ-ритмов преимущественно в области фронтальной коры (электроды FP1 и FP2). Галоперидол увеличивал среднюю мощность преимущественно  $\alpha$ - и  $\beta$ -НЧ ритмов в отведениях FP1 и FP1, а также  $\alpha$ -ритмов в затылочной области. Дроперидол оказывал схожие эффекты, при этом дополнительно активируя  $\theta$ -активность во фронтальной коре. Тиаприд и сульпирид, как и предыдущие препараты, увеличивали среднюю мощность в  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -диапазонах, однако их эффекты в отличие от хлор-



**Рис. 3.** Факторные нагрузки, показывающие степень вовлечения каждого из 132 анализируемых параметров в формирование компонент PC, PC2, PC3, PC4 и PC5, используемых для дальнейших вычислений с использованием наивного байесовского классификатора. Амр – амплитуда (мкВ), RMS – среднеквадратичное отклонение (мкВ), Lempel–Ziv – степень сжатия по Лемпел–Зив (%), ind – индекс ритма (%), mp – средняя мощность ритма (мкВ<sup>2</sup>).

промазина, галоперидола и дроперидола не были локализованы в какой-либо конкретной области коры и были менее выражены.

При проведении анализа данных МГК было получено, что 84.8% всей дисперсии описывают первые пять компонент (PC1–PC5), которые были использованы для дальнейших расчетов. Для каждого из анализируемых параметров ЭКОГ были получены соответствующие факторные нагрузки, позволяющие оценить вклад этих параметров в формирование той или иной главной компоненты (рис. 3). Компоненту PC1, описывающую 55.3% дисперсии данных, формировали такие амплитудные характеристики сигнала, как максимальная и средняя амплитуды, среднеквадратичное отклонение, степень сжатия по Лемпел–Зив, а также средние амплитуды и мощности  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ритмов. Важно отметить, что все перечисленные параметры ЭКОГ влияли на значение PC1 вне зависимости от регистрирующего отведения. На долю компоненты PC2 приходилось 13.4% дисперсии, и наибольшее влияние на ее значения оказывали индексы и средняя мощность  $\beta$ -НЧ- и ВЧ-ритмов во всех областях регистрации сигнала. Компонента PC3 (8.4% дисперсии) складывалась из соотношения индексов  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ -ритмов вне зависимости от локализации сигнала. PC4 (4.2%) формировалась средней амплитудой  $\theta$ -ритмов в отведениях C3 и C4 (область первичной сенсомоторной коры над гиппокампом), а также индексом  $\alpha$ -ритма во всех отведениях. Компонента PC5 описывала 3.5% дисперсии и определялась значениями индексов  $\beta$ -НЧ-ритмов в областях затылочных электродов O1 и O2.

**Таблица 1.** Пример рассчитанных значений главных компонент PC1–PC5 для 10 записей, полученных после введения NaCl

Запись	Компоненты				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
1	-7.639	0.007	3.371	-2.235	-0.712
2	-4.682	0.501	4.678	0.115	1.715
3	-5.366	1.446	1.929	-0.323	-0.812
4	-10.583	1.806	-2.936	-1.670	-4.482
5	-10.227	3.062	-0.452	-1.344	-2.462
6	-3.276	-0.527	2.235	-0.955	0.347
7	-7.187	2.798	-4.214	1.669	-0.638
8	-2.280	1.022	5.025	-0.619	0.954
9	-5.778	-1.553	4.675	-2.665	0.216
10	-7.892	-3.020	6.782	-3.788	1.273

Таким образом, для каждой записи был осуществлен пересчет значений параметров ЭКоГ (132 показателя) на значения главных компонент PC1–PC5 (табл. 1). Было отмечено, что изучаемые препараты оказывают выраженное влияние на величину показателей PC1–PC5, при этом выявлялась специфичность и разнонаправленность их действия (рис. 2*b*). Введение амитриптилина, феназепам, галоперидола и дроперидола статистически значимо ( $p < 0.01$  для амитриптилина и феназепам,  $p < 0.05$  для галоперидола и дроперидола) увеличивало значение компоненты PC1 по сравнению с контрольной группой. Величина PC2 уменьшалась при введении амитриптилина ( $p < 0.05$ ) и, напротив, увеличивалась у животных, получавших феназепам ( $p < 0.05$ ). У крыс, которым вводили амитриптилин, также было отмечено снижение компоненты PC3 по сравнению с контрольной группой ( $p < 0.05$ ). Компонент PC4 статистически значимо ( $p < 0.01$ ) увеличивалась при введении хлорпромазина. Ни один из испытуемых препаратов не оказывал значимого влияния на величину компоненты PC5, однако была отмечена тенденция к ее увеличению у групп галоперидола и дроперидола, а также к снижению — у группы феназепам.

Следующим этапом работы была классификация полученных записей на основании их значений главных компонент с использованием НБК. Для каждой анализируемой записи были рассчитаны доли вероятности совпадения эффектов на ЭКоГ с эффектами других групп препаратов, используемых в обучающей выборке (табл. 2). Полученные значения усредняли для каждой группы, на основании чего можно было сделать выводы о сходстве эффектов тех или иных психотропных препаратов (рис. 2*c*). Например, было показано, что хлорпромазин оказывал наиболее схожие эффекты с амитриптилином и дроперидолом (доли вероятности — 0.281 и 0.216 соответственно). Действие галоперидола напоминало, в большей степени, эффекты дроперидола (0.206), хлорпромазина (0.210) и сульпирида (0.220). Для галоперидола было показано сходство с дроперидолом (0.268) и тиапридом (0.288), а для тиаприда — с сульпиридом (0.231) и дроперидолом (0.214). Наиболее избирательным прогноз был для сульпирида — доля вероятности сходства с тиапридом составила 0.405. Ни для одного из антипсихотических средств не была показана высокая вероятность сходства с NaCl или феназепамом. НБК продемонстрировал

**Таблица 2.** Пример рассчитанных значений вероятности совпадения влияния эффектов сульпирида у 10 животных с эффектами других изучаемых препаратов

Запись	Препараты							
	NaCl	Амитриптилин	Галантамин	Тиаприд	Дроперидол	Хлорпромазин	Феназепам	Галоперидол
1	0.290	0.024	0.059	0.421	0.172	0.008	0.002	0.023
2	0.037	0.042	0.101	0.396	0.228	0.017	0.006	0.173
3	0.176	0.009	0.120	0.462	0.102	0.021	0.000	0.109
4	0.017	0.147	0.018	0.215	0.569	0.018	0.012	0.004
5	0.084	0.005	0.061	0.641	0.120	0.008	0.001	0.080
6	0.221	0.003	0.067	0.569	0.079	0.005	0.000	0.055
7	0.255	0.014	0.108	0.448	0.088	0.007	0.003	0.076
8	0.008	0.006	0.072	0.353	0.124	0.020	0.001	0.416
9	0.047	0.018	0.080	0.446	0.213	0.023	0.001	0.172
10	0.188	0.128	0.181	0.100	0.152	0.212	0.001	0.037

умеренное сходство эффектов испытуемых средств с галантамином, причем наибольшее было отмечено у тиаприда (0.147), наименьшее – у дроперидола и сульпирида (0.086 и 0.087).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе показано, что метод фармако-ЭКоГ у крыс в комбинации с МГК и НБК может быть использован для сравнения профилей антипсихотических средств, а также для отличия их эффектов от средств с антидепрессивным и седативным действием (на примере амитриптилина и феназепама). Для всех пяти изучаемых антипсихотиков было показано сходство с наиболее близкими по фармакологическому действию препаратами. Например, эффекты хлорпромазина на амплитудно-спектральные характеристики ЭКоГ были наиболее близкими к таковым дроперидола и галоперидола, что является справедливым, поскольку все препараты оказывают сильное антипсихотическое действие, связанное с выраженной или умеренной блокадой  $D_2$ -рецепторов [2]. Сходство хлорпромазина с амитриптилином также не является неожиданным, поскольку несмотря на то, что препараты представляют разные фармакологические группы, оба проявляют антагонизм по отношению к М-холино-,  $\alpha_1$ -адрено- и  $H_1$ -гистаминовым рецепторам [2, 24].

Аналогичным образом характер действия галоперидола был похож на таковой дроперидола и хлорпромазина. Тем не менее, высокая вероятность совпадения его эффектов с сульпиридом оказалась неожиданной. С одной стороны, оба препарата являются антипсихотическими средствами, однако для галоперидола вероятность совпадения с другим атипичным нейролептиком тиапридом была невысока. Обращает на себя внимание то, что для дроперидола, в отличие от галоперидола, была показана высокая степень сходства с тиапридом. Таким образом, можно провести условную черту между галоперидолом, схожим с хлорпромазином и сульпиридом, и дроперидолом, похожим по своим эффектам на тиаприд. На основании данных исследований *in vitro* можно предположить, что сходство двух последних связано с их наибольшим аффинитетом к  $D_4$ -рецепторам (табл. 3). Выраженное сходство сульпирида с тиапридом наиболее вероятно отражает то, что оба препарата близки по

**Таблица 3.** Значения констант ингибирования ( $K_i$ , нМ), отражающие аффинитет изучаемых антипсихотиков к различным рецепторам [25–27]

Рецептор	Препараты				
	Хлорпромазин	Галоперидол	Дроперидол	Сульпирид	Тиаприд
Дофаминовые рецепторы					
D <sub>1</sub>	6.3	83	880	N/A	N/A
D <sub>2</sub>	11	2.0	0.25	8.2	226
D <sub>3</sub>	9.7	4.0	N/A	7.9	324
D <sub>4</sub>	56	48	0.84	54	14
D <sub>5</sub>	N/A	147	N/A	N/A	N/A
Серотониновые рецепторы					
5-НТ <sub>1A</sub>	840	1200	N/A	N/A	N/A
5-НТ <sub>2A</sub>	N/A	70	4.6	>10000	N/A
5-НТ <sub>2C</sub>	N/A	5000	N/A	N/A	N/A
Другие					
$\alpha_1$ -АР	1.4	12	N/A	N/A	N/A
H <sub>1</sub> -ГР	25	3000	N/A	N/A	N/A
M <sub>1</sub> -ХР	1.5	>10000	N/A	N/A	N/A

АР – адренорецептор, ГР – гистаминовый рецептор, ХР – холинорецептор, N/A – нет данных.

химической структуре (являются замещенными бензамидами). Следует также учитывать, что на ЭЭГ-картине действия препаратов может сказываться их различная избирательность в отношении рецепторов одного и того же типа, но находящихся в разных областях (нигростриарной, мезокортикальной или мезолимбической).

Одна из рабочих гипотез настоящего исследования заключалась в том, что реализуемый подход может быть пригоден для выявления ранних признаков возможных экстрапирамидных нарушений у животных, возникающих в результате введения так называемых типичных антипсихотических средств. Поскольку при применении типичных нейролептиков развитие таких экстрапирамидных нарушений, как брадикинезия, ригидность мышц и тремор во многом связано с гипертономусом холинергической иннервации в головном мозге [19], было выдвинуто предположение, что такие изменения работы нейромедиаторных систем могут быть выявлены при регистрации ЭКоГ уже на раннем этапе. Именно поэтому в качестве одного из референтных средств был выбран ингибитор ацетилхолинэстеразы – галантамин, обладающий ярко выраженным холинергическим действием. Несмотря на то, что в данной работе для всех пяти антипсихотиков было показано некоторое сходство с галантамином (практически всегда выше, чем с NaCl или феназепамом), результат нельзя считать положительным, поскольку наиболее “холинотропным” был тиаприд, в клинической практике нечасто вызывающий экстрапирамидные нарушения [28]. Тем не менее, идея поиска ранних предикторов возможных экстрапирамидных нарушений с помощью фармако-ЭЭГ остается привлекательной и заслуживает внимания в дальнейших исследованиях.

В проведенной работе были использованы дозы препаратов, оказывающие выраженный эффект на поведение или параметры ЭКоГ животных, приведенные в ранее опубликованных работах. Безусловно, для решения задач классификации и прогнозирования вопрос выбранных дозировок является одним из ключевых, поскольку рассчитанные вероятности отнесения препарата к той или иной группе могут кардинально меняться при многократном увеличении или уменьшении дозы. Например, для антипсихотиков с увеличением дозы возникают седативные и антихолинергические эффекты, которые, безусловно, будут сказываться на регистрируемой биоэлектрической активности головного мозга [29]. В связи с этим для дальнейшего развития предлагаемого метода как инструмента фармакологического скрининга необходимо пополнение обучающей выборки записями эффектов известных препаратов в нескольких диапазонах доз.

Идея использования фармако-ЭЭГ у лабораторных животных не является принципиально новым подходом в биомедицинских исследованиях. Данный метод неоднократно использовался разными научными группами для характеристики функциональных эффектов потенциальных или уже известных психоактивных соединений [30–33], выявления возможных побочных эффектов (например, снотворного) [34] или токсического действия (эпилептогенная активность и др.) [35].

Отдельного внимания заслуживают исследования научной группы Dimpfel, первые результаты которых были опубликованы в середине 80-х годов и продолжают выходить в свет по настоящее время. В работе 1984 г. [36] авторами был применен дискриминантный анализ для различия действия сульпирида, клозапина и галоперидола на основании сравнения с эффектами амфетамина, диазепама, имипрамина и хлорпромазина. В качестве входных данных были использованы соотношения до и после введения препарата абсолютных мощностей  $\delta$ -,  $\theta$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -ритмов сигналов, записанных билатерально в областях проекций сенсомоторной коры, стриатума и ретикулярной формации. Последующие работы были посвящены записи эффектов различных групп препаратов, что в дальнейшем позволило авторам собрать библиотеку т.н. электрофармакограмм [37], включающую нейролептики, опиоидные и неопиоидные анальгетики, антидепрессанты, психостимуляторы, седативные и противосудорожные средства и даже галлюциногены (LSD, МК 801 и др.). С 2009 г. по настоящее время данная библиотека активно используется для изучения эффектов растительных извлечений. Например, было спрогнозировано антидепрессивное действие флавоноидов рутин и кверцетин [20] и ряда других соединений, а также предложен вариант фармакологической классификации растительных экстрактов на основании их электрофармакограмм [38].

Схожий подход был разработан голландскими исследователями Krijger и соавт. в 1993 г. [30]. Регистрацию биоэлектрической активности головного мозга осуществляли с фронтальной и париетальной областей коры (получали дифференциальный сигнал), в качестве входных данных для дальнейшего анализа были использованы значения соотношений мощности 256 спектральных диапазонов от 0.36 до 100 Гц до введения препарата и через 20 и 45 мин после. Дисперсионный анализ,  $t$ -тест и последующая нормализация по степеням свободы преобразовывали полученные значения первичного анализа в так называемые  $n$ -профили. Дальнейший дискриминантный анализ позволял сравнивать между собой  $n$ -профили препаратов разных групп и различать между собой эффекты антидепрессантов, нейролептиков, анксиолитиков и психостимуляторов. Предложенный метод позволил спрогнозировать антидепрессивное и анксиолитическое действие E-10-гидроксинортриптилина, активного метаболита нортриптилина, что подтвердило предыдущие клинические наблюдения у пациентов с депрессией [31]. Несмотря на положительные результаты, данный подход не получил развития, и приведенное выше

исследование является последней опубликованной работой, где были использованы n-профили для прогнозирования фармакологической активности.

ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России” (Московская область) предложил еще один метод прогнозирования, в котором в качестве модельного объекта была выбрана кошка [39, 40]. Регистрацию биоэлектрической активности мозга осуществляли глубинными электродами, имплантированными в поясную извилину, гипоталамус, хвостатое ядро и другие структуры. Оценка профиля фармакологической активности испытуемых психотропных препаратов была основана на сравнении нормализованных значений спектральной мощности с таковыми для референтных препаратов. С помощью данного метода было показано, что лейцинэнкефалин лейтрагин обладает схожими эффектами с оригинальным синтетическим аналогом фрагмента адренкортикотропного гормона (АКТГ<sub>4-10</sub>), что, согласно предположению авторов, отражает механизмы ГАМК-ергической модуляции гиппокампа и префронтальной коры [41].

Таким образом, результаты вышеприведенных работ свидетельствуют о том, что метод фармако-ЭЭГ у лабораторных животных может быть использован для выявления и определения эффектов препаратов, оказывающих влияние на функции центральной нервной системы. Пример исследований Dimpfel и соавт. показывает, что этот экспериментальный подход не остался рудиментом нейробиологических исследований, но может быть успешно использован для решения исследовательских задач в настоящее время. На основании результатов данного исследования и сравнения с работами других авторов можно сделать вывод, что для решения задач классификации и прогнозирования могут быть использованы различные математические подходы. Анализ данных биоэлектрической активности головного мозга позволяет рассчитывать десятки и даже сотни амплитудно-спектральных характеристик сигналов, однако для успешного применения различных классификаторов необходимы грамотные подходы уменьшения размерности либо выявления показателей, наиболее чувствительных к фармакологическому воздействию. Особенно важно, что с появлением новых методов машинного обучения полученные данные не теряют свою актуальность и могут представлять плодородную почву для исследовательской работы не только нейрофармакологов, но и специалистов из областей математики и информационных технологий.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России” в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 г. при финансовой поддержке Минобрнауки России. Работа выполнена в рамках проекта № 93022798 Санкт-Петербургского государственного университета.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование эксперимента (Ю.И.С., С.В.О.), проведение экспериментов и обработка данных (Ю.И.С., Д.Д.Ш., М.М.П., В.А.П., Р.Д.И., А.А.К.), подготовка иллюстраций (Ю.И.С., Д.Д.Ш., В.А.П.), подготовка и редакция рукописи (Ю.И.С., В.А.П., С.В.О.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lally J, MacCabe JH* (2015) Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *Br Med Bull* 114(1): 169–179.  
<https://doi.org/10.1093/bmb/ldv017>
2. *Дробижев МЮ, Овчинников АА* (2010) Антипсихотики: меняем старые поколения на новую классификацию? Социальная и клиническая психиатрия 20(2): 80–87. [*Drobizhev MYu, Ovchinnikov AA* (2010) Antipsychotics: replacing the old generations with a new classification? *Sotsialnaia i klinicheskaia psikhiatriia* 20(2): 80–87. (In Russ)].
3. *Калитин КЮ, Спасов АА, Муха ОЮ, Придворов ГВ, Липатов ВА* (2021) Фармакологические мишени и механизм действия антипсихотических средств в рамках нейрохимической теории патогенеза шизофрении. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 107(8): 927–954. [*Kalitin KY, Spasov AA, Mukha OY, Pridvorov GV, Lipatov VA* (2021) Pharmacological targets and the mechanism of action of antipsychotic agents in the framework of the neurochemical theory of the pathogenesis of schizophrenia. *Russ J Physiol* 107(8): 927–954. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S0869813921080070>
4. *Winship IR, Dursun SM, Baker GB, Balista PA, Kandratavicius L, Maia-de-Oliveira JP, Hallak J, Howland JG* (2019) An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. *Can J Psychiatry* 64(1): 5–17.  
<https://doi.org/10.1177/0706743718773728>
5. *Ang MJ, Lee S, Kim JC, Kim SH, Moon C* (2021) Behavioral Tasks Evaluating Schizophrenia-like Symptoms in Animal Models: A Recent Update. *Curr Neuropharmacol* 19(5): 641–664.  
<https://doi.org/10.2174/1570159X18666200814175114>
6. *Itil T, Shapiro D, Hickman C, Fink M, Kiremitci N* (1968) The differentiation of tranquilizers by quantitative EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 24(3): 288.
7. *Itil TM, Ulett GA, Fukuda T* (1971) Quantitative pharmacoelectroencephalography in early evaluation of psychotropic drugs. *Folia Psychiatr Neurol Jpn* 25(3): 195–202.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.1971.tb01503.x>
8. *Каркищенко НН, Каркищенко ВН, Фокин ЮВ, Таболякова ЛА, Алимкина ОВ, Борисова ММ* (2020) Между когнитивностью и нейропатиями: нейровизуализация эффектов ГАМК-ергической модуляции гиппокампа и префронтального неокортекса по нормированным электрограммам мозга. *Биомедицина* 16(2): 12–38. [*Karkischenko NN, Karkischenko VN, Fokin YuV, Taboyakova LA, Alimkina OV, Borisova MM* (2020) Between Cognition and Neuropathies: Neuroimaging of the Effects of GABAergic Modulation of the Hippocampus and Prefrontal Neocortex by Normalized Brain Electrograms. *J Biomed* 16(2): 12–38. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-2-12-38>
9. *Каркищенко НН, Фокин ЮВ, Таболякова ЛА, Алимкина ОВ, Борисова ММ* (2020) Новые биомедицинские подходы в информационно-когнитивных технологиях фармако-ЭЭГ моделирования психопатологий. *Биомедицина* 16(3): 35–38. [*Karkischenko NN, Fokin YuV, Taboyakova LA, Alimkina OV, Borisova MM* (2020) New Biomedical Approaches in Information and Cognitive Technologies of Psychopathology Modeling. *J Biomed* 16(3): 35–38. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-35-38>
10. *Куделина ОМ, Сафроненко АВ, Макляков ЮС, Ганцгорн ЕВ, Морозов НМ, Джабр МА* (2020) Аналитическая оценка лечения депрессии в эксперименте на животных посредством количественной фармако-ЭЭГ. *Биомедицина* 16(3): 43–47. [*Kudelina OM, Safronenko AV, Maklyakov YuS, Gantsgorn EV, Morozov NM, Jabr MA* (2020) Analytical Evaluation of Treating Depression in Animal Models by Quantitative Pharmacoelectroencephalography. *J Biomed* 16(3): 43–47. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-43-47>
11. *Яковлев ОА, Вахвияйнен МС, Юдин МА* (2020) Фармако-ЭЭГ как способ определения пороговой дозы нейротропных веществ. *Биомедицина* 16(3): 39–42. [*Yakovlev OA, Vakhviaynen MS, Yudin MA* (2020) Pharmacoelectroencephalography as a Method for Determining the Threshold Dose of Neurotropic Substances. *J Biomed* 16(3): 39–42. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-39-42>
12. *Patel L, Shukla T, Huang X, Ussery DW, Wang S* (2020) Machine Learning Methods in Drug Discovery. *Molecules* 25(22): 5277.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25225277>
13. *Guo B, Zheng Q* (2015) Using Naïve Bayes Algorithm to Estimate the Response to Drug in Lung Cancer Patients. *Comb Chem High Throughput Screen* 21(10): 734–748.  
<https://doi.org/10.2174/1386207322666190125151624>
14. *Muchira JM, Gona PN, Leveille S, Hayman LL* (2019) A Review of Methodological Approaches for Developing Diagnostic Algorithms for Diabetes Screening. *J Nurs Meas* 27(3): 433–457.  
<https://doi.org/10.1891/1061-3749.27.3.433>

15. Zhang H, Ding L, Zou Y, Hu SQ, Huang HG, Kong WB, Zhang J (2016) Predicting drug-induced liver injury in human with Naïve Bayes classifier approach. *J Comput Aided Mol Des* 30(10): 889–898.  
<https://doi.org/10.1007/s10822-016-9972-6>
16. Rescorla M (2021) Bayesian modeling of the mind: from norms to neurons. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci* 12(1): e1540.  
<https://doi.org/10.1002/wcs.1540>
17. Сысоев ЮИ, Приходько ВА, Идиятуллин РД, Черняков РТ, Карев ВЕ, Оковитый СВ (2022) Метод регистрации биоэлектрической активности коры головного мозга у крыс в условиях хронического эксперимента. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(2): 279–290. [Sysoev YuI, Prikhodko VA, Idiyatullin RD, Chernyakov RT, Karev VE, Okovityi SV (2022) A Method for Chronic Registration of Brain Cortical Electrical Activity in Rats. *Russ J Physiol* 108(2): 279–290. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.1134/S0869813919060074>
18. Hansen IH, Agerskov C, Arvastson L, Bastlund JF, Sørensen HBD, Herrik KF (2019) Pharmacoelectroencephalographic responses in the rat differ between active and inactive locomotor states. *Eur J Neurosci* 50(2): 1948–1971.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.14373>
19. Liu C (2020) Targeting the cholinergic system in Parkinson’s disease. *Acta Pharmacol Sin* 41(4): 453–463.  
<https://doi.org/10.1038/s41401-020-0380-z>
20. Dimpfel W (2009) Rat electropharmacograms of the flavonoids rutin and quercetin in comparison to those of moclobemide and clinically used reference drugs suggest antidepressive and/or neuroprotective action. *Phytomedicine* 16(4): 287–294.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.02.005>
21. Mar AC, Nilsson SRO, Gamallo-Lana B, Lei M, Dourado T, Alsiö J, Saksida LM, Bussey TJ, Robbins TW (2017) MAM-E17 rat model impairments on a novel continuous performance task: effects of potential cognitive enhancing drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 234(19): 2837–2857.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-017-4679-5>
22. Scatton B, Cohen C, Perrault G, Oblin A, Claustre Y, Schoemaker H, Sanger DJ, Rouquier L, Porsolt R (2001) The preclinical pharmacologic profile of tiapride. *Eur Psychiatry* 16 Suppl 1: 29s–34s.  
[https://doi.org/10.1016/s0924-9338\(00\)00526-5](https://doi.org/10.1016/s0924-9338(00)00526-5)
23. Ringnér M (2008) What is principal component analysis? *Nat Biotechnol* 26(3): 303–304.  
<https://doi.org/10.1038/nbt0308-303>
24. McClure EW, Daniels RN (2021) Classics in Chemical Neuroscience: Amitriptyline. *ACS Chem Neurosci* 12(3): 354–362.  
<https://doi.org/10.1021/acscemneuro.0c00467>
25. Donahue TJ, Hillhouse TM, Webster KA, Young R, De Oliveira EO, Porter JH (2017) Discriminative stimulus properties of the atypical antipsychotic amisulpride: comparison to its isomers and to other benzamide derivatives, antipsychotic, antidepressant, and antianxiety drugs in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 234(23–24): 3507–3520.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-017-4738-y>
26. Li P, Snyder GL, Vanover KE (2016) Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future. *Curr Top Med Chem* 16(29): 3385–3403.  
<https://doi.org/10.2174/1568026616666160608084834>
27. Yonemura K, Miyanaga K, Machiyama Y (1998) Profiles of the affinity of antipsychotic drugs for neurotransmitter receptors and their clinical implication. *Kitakanto Med J* 48(2): 87–102.  
<https://doi.org/10.2974/kmj.48.87>
28. Dose M, Lange HW (2000) The benzamide tiapride: treatment of extrapyramidal motor and other clinical syndromes. *Pharmacopsychiatry* 33(1): 19–27.  
<https://doi.org/10.1055/s-2000-7964>
29. Haddad PM, Sharma SG (2007) Adverse effects of atypical antipsychotics: differential risk and clinical implications. *CNS Drugs* 21(11): 911–936.  
<https://doi.org/10.2165/00023210-200721110-00004>
30. Krijzer F, Koopman P, Olivier B (1993) Classification of psychotropic drugs based on pharmacoelectrocorticographic studies in vigilance-controlled rats. *Neuropsychobiology* 28(3): 122–37.  
<https://doi.org/10.1159/000119015>
31. Nordin C, Krijzer F (1996) Antidepressant and anxiolytic profiles of E-10-hydroxynortriptyline on electrocorticograms of rats. *Neuropsychobiology* 34(1): 44–48.  
<https://doi.org/10.1159/000119290>
32. Papp N, Vas S, Bogáthy E, Kátai Z, Kostyalik D, Bagdy G (2018) Acute and chronic escitalopram alter EEG gamma oscillations differently: relevance to therapeutic effects. *Eur J Pharm Sci* 121:

- 347–355.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.06.012>
33. *Rujiralai T, Puangpairote T, Cheaha D* (2021) Characterization of pharmaco-EEG fingerprint and sleep-wake profiles of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil inhalation and diazepam administration in rats. *J Ethnopharmacol* 276: 114193.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114193>
  34. *Depoortere H, Decobert M, Granger P, Riou-Merle F* (1986) Hypnotics: clinical value of pharmaco-EEG methods. *Neuropsychobiology* 16(2–3): 157–162.  
<https://doi.org/10.1159/000118318>
  35. *Krijzer F, Snelder M, Bradford D* (1984) Comparison of the (pro)convulsive properties of fluvoxamine and clovoxamine with eight other antidepressants in an animal model. *Neuropsychobiology* 12(4): 249–254.  
<https://doi.org/10.1159/000118147>
  36. *Dimpfel W, Decker H* (1985) Classification of sulpiride, clozapine and haloperidol by toposelective recording from different brain structures in the immobilized rat (stereo-EEG). *Neuropsychobiology* 14(3): 157–164.  
<https://doi.org/10.1159/000118220>
  37. *Dimpfel W* (2003) Preclinical data base of pharmaco-specific rat EEG fingerprints (tele-stereo-EEG). *Eur J Med Res* 8(5): 199–207.
  38. *Dimpfel W* (2013) Pharmacological classification of herbal extracts by means of comparison to spectral EEG signatures induced by synthetic drugs in the freely moving rat. *J Ethnopharmacol* 149(2): 583–589.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.07.029>
  39. *Каркищенко НН, Фокин ЮВ, Каркищенко ВН, Таболякова ЛА, Харитонов СЮ, Алимкина ОВ* (2018) Новые подходы к оценке интрацентральных отношений по показателям оперантного поведения и электрограмм мозга кошек. *Биомедицина* (4): 4–17. [*Karkischenko NN, Fokin YuV, Karkischenko VN, Taboyakova LA, Kharitonov SYu, Alimkina OV* (2020) New approaches to the assessment of intracentral relations in terms of operant behavior and electrograms of the brain of cats. *J Biomed* (4): 4–17. (In Russ)].
  40. *Каркищенко НН, Каркищенко ВН, Фокин ЮВ, Харитонов СЮ* (2019) Нейровизуализация эффектов психоактивных средств посредством нормализации электрограмм головного мозга. *Биомедицина* (1): 12–34. [*Karkischenko NN, Karkischenko VN, Fokin YuV, Kharitonov SYu* (2019) Neuroimaging of the effects of psychoactive substances by means of normalization of brain electrograms. *J Biomed* (1): 12–34. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-1-12-34>
  41. *Фокин ЮВ, Каркищенко НН, Борисова ММ* (2020) Нейровизуализация фармако-ЭЭГ эффектов лейтрагина посредством нормированных электрограмм мозга кошек. *Биомедицина* 16(4): 71–82. [*Fokin YuV, Karkischenko NN, Borisova MM* (2020) Neurovisualization of Pharmaco-EEG Effects of Leutragine by Normalized Cat Brain Electrograms. *J Biomed* 16(4): 71–82. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-4-71-82>

### Use of Naive Bayes Classifier to Assess the Effects of Antipsychotic Agents on Brain Electrical Activity Parameters in Rats

Yu. I. Sysoev<sup>a, b, c, d, \*</sup>, D. D. Shite<sup>a</sup>, M. M. Puchik<sup>a</sup>, V. A. Prikhodko<sup>a, d</sup>, R. D. Idiyatullin<sup>a</sup>, A. A. Kotelnikova<sup>a</sup>, and S. V. Okovitya<sup>a, d</sup>

<sup>a</sup>*Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russia*

<sup>b</sup>*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>c</sup>*Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

<sup>d</sup>*Bechtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russia*

\*e-mail: susoyev92@mail.ru

Research and development of novel methods to determine the effects of antipsychotic agents is an important challenge for experimental biomedicine. Although behavioural tests, the ones most commonly used for pharmacological screening, are quite efficient for the evaluation of drug effects on animal anxiety and locomotion, they hardly allow to detect antipsychotic activity. Pharmacoelectroencephalography (pharmaco-EEG), which is based on the principle of different psychoactive agents producing distinct

changes in brain electrical activity, could represent a viable alternative approach to that task. The rapid evolution of machine learning techniques has opened new possibilities for using pharmaco-EEG data for the purposes of classification and prediction. This work describes an experimental approach to the assessment of specific activity and pharmacological profiling of antipsychotic agents using naïve Bayes classifier, a simple probabilistic classifier widely employed in biomedical research. The experiments were conducted in Wistar male rats with chronically implanted electrocorticographic electrodes. To serve as the training set, a library was assembled containing electrocorticograms (ECoG) following the administration of antipsychotic agents: chlorpromazine, haloperidol, droperidol, tiapride, and sulpiride. For each sample, ECoG parameters before and after drug administration were calculated, and a total of 132 amplitude and spectral signal parameters were taken into analysis. Principal component analysis was used to reduce dimensionality. Using naïve Bayes classifier, we were able to detect and qualify distinct effects of antipsychotic agents on brain electrical activity parameters in rats, allowing them to be differentiated from phenazepam, a benzodiazepine tranquilizer with sedative properties. Moreover, this approach proved effective to distinguish among the antipsychotics as well as between them and other agents with similar receptor binding affinity profiles, e.g., the tricyclic antidepressant amitriptyline. Thus, the method we propose can be used to discern between antipsychotic and sedative effects of drugs as well as to compare the effects across different antipsychotic agents.

*Keywords:* naïve Bayes classifier, machine learning, pharmacoencephalography, electrocorticography, antipsychotics

---

---

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**

---

---

**ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОГЛИИ СПИННОГО МОЗГА КРЫС**© 2022 г. Е. А. Колос<sup>1</sup>, \*, Д. Э. Коржевский<sup>1</sup><sup>1</sup>*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия**\*E-mail: koloselena1984@yandex.ru*

Поступила в редакцию 25.05.2022 г.

После доработки 16.06.2022 г.

Принята к публикации 16.06.2022 г.

Целью настоящего исследования явилась оценка изменений микроглии в различных областях шейного отдела спинного мозга (СМ) молодых (4 мес.) и стареющих (18 мес.) крыс с использованием иммуногистохимических маркеров. Для идентификации клеток микроглии применяли антитела к кальций-связывающему белку Iba-1. Для оценки изменения количества нейронов СМ при старении использовали антитела к ядерному антигену нервных клеток (NeuN). В работе выявлены региональные различия реакции микроглиоцитов на старение. Установлено, что реактивные изменения микроглиоцитов у стареющих крыс более выражены в белом, а не в сером веществе, что, вероятно, связано с активными процессами де- и ремиелинизации нервных волокон СМ, характерными для поздних стадий онтогенеза. Отмечено, что наибольшие изменения претерпевает микроглия дорсального и вентрального канатика. Известно, что именно эти пути обеспечивают восприятие сенсорной информации от внешних раздражителей, оценку ее интенсивности, типа и последующую двигательную активность. В области дорсального и вентрального канатиков идентифицированы ранее не описанные исследователями скопления (агрегаты) активированных микроглиоцитов, предположительно участвующих в процессах демиелинизации. Полученные результаты свидетельствуют в пользу участия микроглии в сенсорных нарушениях, связанных со старением.

*Ключевые слова:* старение, микроглия, спинной мозг, иммуногистохимия, белок Iba-1

DOI: 10.31857/S0869813922070044

Возрастные изменения биохимических процессов и физиологических функций органов и систем организма могут создать предпосылки для развития тяжелых заболеваний нервной системы в пожилом возрасте. В связи с этим в настоящее время активно изучаются клеточные и молекулярные процессы, происходящие при старении. С возрастом увеличивается частота сенсорных и двигательных нарушений, точные механизмы которых остаются неясными. Хорошо известно, что структурные и функциональные изменения микроглиоцитов при старении играют центральную роль в патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний [1–3]. Микроглиоциты представляют собой резидентные иммунные клетки ЦНС. В интактной нервной системе микроглия поддерживает гомеостаз нервной ткани, выполняя широкий спектр функций: фагоцитирует погибшие клетки и их фрагменты, удаляет неправильно агрегированные белки, ремоделирует нейронные сети, модулирует активность астроцитов и нейронов, выполняет нейропротекторные функции, способ-

ствуется процессам ремиелинизации [4–6]. В ответ на повреждение ЦНС и нарушение гомеостаза, микроглиальные клетки претерпевают процесс активации, который сопровождается морфологическими и молекулярными изменениями. Было высказано предположение, что микроглиоциты ЦНС в раннем и позднем периоде жизни отличаются фенотипически, что связано с изменением функций микроглии во время старения: снижение способности к хемотаксису, фагоцитозу и контролю гомеостаза, поляризации в сторону провоспалительного фенотипа [7–11]. При этом остается неясным, какую роль возрастные изменения микроглиоцитов спинного мозга (СМ) вносят в предрасположенность к нейродегенеративным заболеваниям. Основная масса современных исследований, посвященных старению, акцентирует внимание на изменениях клеток микроглии головного мозга [12–17]. Однако анализ современных данных показывает, что микроглиоциты СМ значительно отличаются от микроглии головного мозга как морфологически, так и функционально [18]. Работы, описывающие особенности глиальных реакций СМ в возрастном аспекте немногочисленны [19–22], несмотря на то, что важность изучения влияния старения на функционирование микроглии СМ очевидна.

Цель настоящего исследования состояла в оценке изменений микроглии в различных зонах шейного отдела СМ молодых (4 мес.) и стареющих (18 мес.) крыс с использованием ряда иммуногистохимических маркеров.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах-самцах Вистар в возрасте 4 ( $n = 5$ ) и 18 месяцев ( $n = 5$ ). Все манипуляции проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” и с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.). Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины” (протокол № 3/19 от 25 апреля 2019 г.).

У молодых и стареющих животных выделяли фрагменты шейного отдела СМ на уровне  $C_{III}$ – $C_V$  сегмента. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [23] в течение 24 ч, затем обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм. На полученных срезах после депарафинирования и регидратации проводили иммуногистохимическую реакцию на белок Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), используя поликлональные козы антитела (разведение 1 : 800, AbCam, Великобритания). Белок Iba-1 является маркером микроглиоцитов нервной системы и других фагоцитирующих клеток [6, 24, 25]. Перед постановкой иммуногистохимической реакции проводили тепловое демаскирование антигенов. Для визуализации прореагировавших антител применяли вторичные биотинилированные антитела из набора VECTASTAIN® Universal Quick kit (PK-8800) (Vector Laboratories Inc, США) с блокировкой неспецифической иммунореактивности нормальной сывороткой крысы. Продукт иммуногистохимической реакции выявляли с применением 3,3'-диаминобензидина (DAB+, K3468, Agilent, США).

Для оценки изменения количества нейронов в сером веществе спинного мозга при старении проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов спинного мозга молодых и стареющих животных с применением антител к ядерному белку нервных клеток (NeuN). Для этого использовали мышинные моноклональные (клон А60) антитела (MAB377, Merck, США). В качестве вторичного реагента применяли набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США) с добавлением нормальной сыворотки крысы. Продукт иммуногистохимической реакции выявляли с применением 3,3'-диаминобензидина (DAB+, K3468, Agilent, США).

Все полученные препараты анализировали с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия), микрофотографии получали с применением камеры ICC50 (Leica, Германия) и программного обеспечения LAS EZ (Leica, Германия). Оценку морфологических и количественных изменений популяции микроглии проводили в нескольких зонах спинного мозга: дорсальном сером веществе (I–V пластинка Рекседа), вентральном сером веществе (VI–X пластинка Рекседа), дорсальном белом веществе (дорсальные канатики), боковом белом веществе (боковые канатики) и вентральном белом веществе (передние канатики). Для оценки реактивных изменений клеток микроглии при старении производили фотосъемку исследуемых областей, расположенных близко друг к другу, но без перекрывания. Было получено не менее четырех изображений на каждую исследуемую зону. Анализ изображений проводили с применением программы ImageJ (NIH, США). В каждой исследуемой зоне спинного мозга молодых и стареющих животных определяли общее число микроглиоцитов на единицу площади исследуемой области, то есть плотность распределения клеток. При подсчете учитывали Iba-1-иммунопозитивные клетки с ядром в плоскости среза. Фрагменты клеток, не содержащие ядро, а также иммунопозитивные отростки не учитывались при количественном анализе. Также в ходе исследования определяли площадь, занимаемую Iba-1-иммунопозитивными микроглиоцитами в каждой исследуемой зоне СМ крыс разных возрастных групп. Данные гистограмм приведены как среднее значение в группе со стандартной ошибкой. При количественной оценке нейронов СМ проводили подсчет числа NeuN-иммунопозитивных клеток, содержащих ядро в плоскости среза, в дорсальном и вентральном сером веществе СМ молодых и стареющих крыс. Статистический анализ различий между группами проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента при  $p < 0.05$ .

Для флуоресцентной микроскопии с целью выявления Iba1-содержащих клеток в качестве вторичных реагентов применяли биотинилированные антитела из набора VECTASTAIN® Universal Quick kit (PK-8800) (Vector Laboratories Inc, США) с добавлением нормальной сыворотки крысы, а также конъюгат стрептавидина с флуорохромом Rhodamine Red-X (AB\_2337247, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, США). Ядра клеток окрашивали ядерным флуоресцентным красителем SYTOX Green (S7020, Invitrogen, США). Препараты анализировали с применением конфокального лазерного микроскопа LSM 800 (Zeiss, Германия). Для возбуждения флуоресценции Rhodamine Red-X (RRX) применяли лазер 561 нм, для SYTOX green – 488 нм. Анализ изображений проводили с использованием программы ZEN 2012 (Zeiss, Германия) и LSM Image Browser (Zeiss, Германия).

Специфичность иммуногистохимической реакции на Iba-1 оценивали при постановке отрицательного и положительного контролей. Для проведения положительного контроля использовались архивные срезы головного мозга взрослых крыс, фиксированные и обработанные таким же образом, как и исследуемый СМ. При постановке отрицательного контроля была исключена инкубация с первичными антителами, на срезы СМ крыс наносили разбавитель для антител (S0809) (Dako, Дания).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При постановке отрицательного контроля для иммуногистохимического выявления Iba-1 на срезах СМ молодых и стареющих животных иммунопозитивных клеток и других структур не обнаружено. При проведении положительного иммуногистохимического контроля для белка Iba-1 позитивная реакция отмечена в клетках головного мозга крыс, обладающих округлым или веретеновидным телом и длинными ветвящимися отростками, то есть в клетках, имеющих типичные мор-

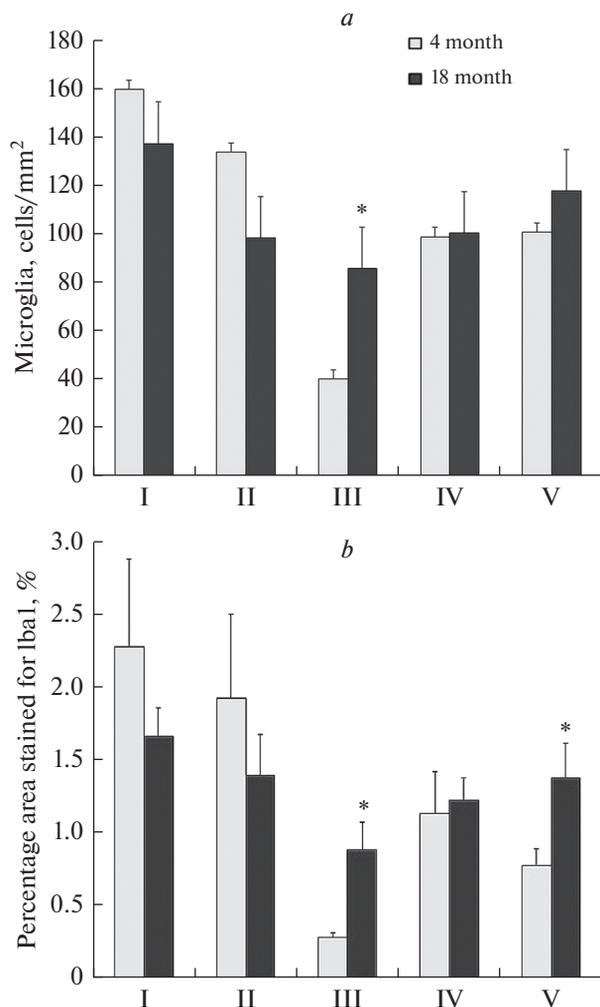
фологические признаки микроглиоцитов. При этом нейроны и другие глиальные клетки (эпендимоциты, астроциты, олигодендроциты) головного мозга взрослых животных не проявляют иммунореактивность, что свидетельствует в пользу высокой специфичности использованного протокола.

В ходе настоящего исследования при анализе микроглиоцитов серого вещества СМ были отмечены некоторые морфологические различия между микроглией молодых и стареющих крыс. В области дорсального серого вещества СМ молодых животных идентифицируются мелкие Iba-1-иммунопозитивные (Iba-1+) клетки, тело которых имеет овальную форму и несколько тонких разветвленных отростков. Также в данной области присутствует большое количество иммунопозитивных тонких отростков микроглиоцитов, тела которых не попали в плоскость среза. Большая часть микроглиоцитов дорсального серого вещества СМ стареющих животных имеет аналогичные морфологические признаки. Однако в ходе исследования отмечено присутствие единичных клеток с короткими толстыми маловетвящимися отростками у животных в возрасте 18 месяцев, то есть единичные микроглиоциты дорсального серого вещества проявляют морфологические признаки активации. При количественной оценке реакции микроглии СМ на старение установлено, что плотность популяции в области дорсального серого вещества СМ не меняется ( $p > 0.05$ ) (рис. 1a). Также установлено, что площадь дорсального серого вещества, занимаемая Iba-1-иммунопозитивными клетками, при старении также не изменяется ( $p > 0.05$ ) (рис. 1b).

В области переднего серого вещества СМ молодых животных присутствуют округлые иммунопозитивные клетки, обладающие несколькими тонкими длинными разветвленными отростками. Также идентифицируется сеть тонких Iba-1-содержащих отростков клеток, тела которых располагаются вне плоскости среза. У стареющих крыс единичные микроглиоциты вентрального серого вещества СМ отличаются более толстыми и укороченными ветвящимися отростками. Такие морфологические особенности клеток могут свидетельствовать об активации микроглиоцитов. Большая часть микроглиоцитов исследуемой области СМ 18-месячных животных сохраняет признаки рамифицированных клеток, однако проявляют некоторое снижение разветвленности отростков. При количественной оценке реакции микроглии СМ на старение установлено, что плотность распределения Iba-1-иммунопозитивных клеток в области вентрального серого вещества СМ с возрастом не изменяется ( $p > 0.05$ ) (рис. 1a). Также установлено, что площадь, занимаемая Iba-1-иммунопозитивными клетками в вентральном сером веществе СМ, при старении не меняется ( $p > 0.05$ ) (рис. 1b).

С применением антител к ядерному белку нервных клеток в ходе настоящего исследования установлено, что количество нейронов задних рогов СМ молодых животных составляет  $69.1 \pm 2.9$  клеток, аналогичный показатель в группе стареющих животных составляет  $72.5 \pm 5.6$  клеток ( $p > 0.05$ ). В области вентральных рогов количество нейронов NeuN-иммунопозитивных клеток составляет  $11.6 \pm 0.3$  клеток. Число нейронов передних рогов СМ при старении также не изменяется и составляет  $11.7 \pm 0.6$  клеток ( $p > 0.05$ ). Также не было отмечено морфологических признаков гибели нейронов СМ.

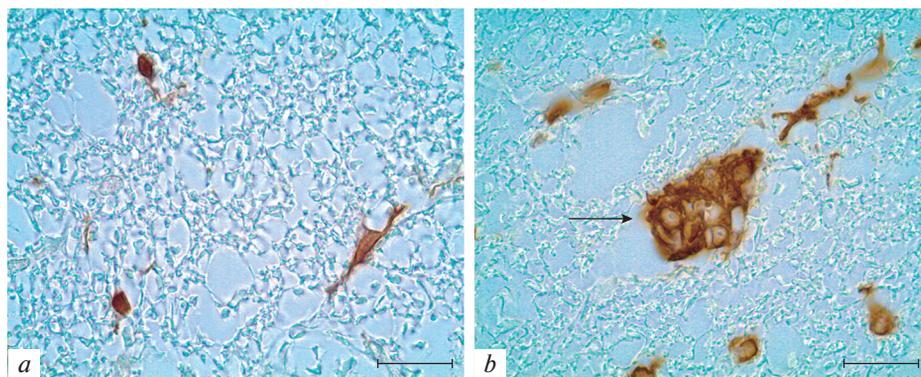
При изучении морфологических особенностей микроглиоцитов белого вещества СМ крыс в возрасте 4 мес. отмечено, что в вентральном, дорсальном и боковом канатике СМ мелкие овальные или округлые Iba-1-иммунопозитивные клетки обладают тонкими отростками, идущими параллельно аксональным путям (рис. 2a). Такие клетки распределены равномерно во всех отделах белого вещества СМ. В боковом и вентральном канатике СМ стареющих животных отмечено преобладание микроглиоцитов с аналогичными морфологическими особенностями. Клетки обладают признакам рамифицированных микроглиоцитов. Однако в вентральном



**Рис. 1.** Изменение плотности популяции микроглии (a) и площади спинного мозга, занимаемой Iba-1+ клетками (b) при старении. I – дорсальное серое вещество СМ; II – вентральное серое вещество СМ; III – дорсальный канатик СМ; IV – латеральный канатик СМ; V – вентральный канатик СМ. \* –  $p < 0.05$ .

белом веществе, в непосредственной близости к передней срединной борозде, отмечается присутствие иммунопозитивных клеток с гипертрофированным клеточным телом и укороченными маловетвистыми отростками. Также в области вентрального канатика СМ стареющих животных обнаруживаются скопления Iba-1-иммунопозитивных клеток (клеточные агрегаты) площадью от 200 до 1100 мкм<sup>2</sup>, содержащие от 4 до 9 ядер. Клетки, образующие такие структуры, обладают малым количеством коротких, сильно утолщенных отростков, которые окружают волокна белого вещества (рис. 2b, 3).

В области дорсального канатика СМ молодых крыс идентифицируются немногочисленные Iba-1-иммунопозитивные округлые и веретеновидные клетки с одним или двумя длинными, тонкими маловетвистыми отростками. Такие клетки



**Рис. 2.** Иммунопозитивные клетки вентрального канатика СМ крыс в возрасте 4 (а) и 18 месяцев (b). Клеточный агрегат, образованный Iba-1-иммунопозитивными клетками в вентральном белом веществе СМ крысы в возрасте 18 месяцев (b). Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1. Масштабный отрезок – 20 мкм.

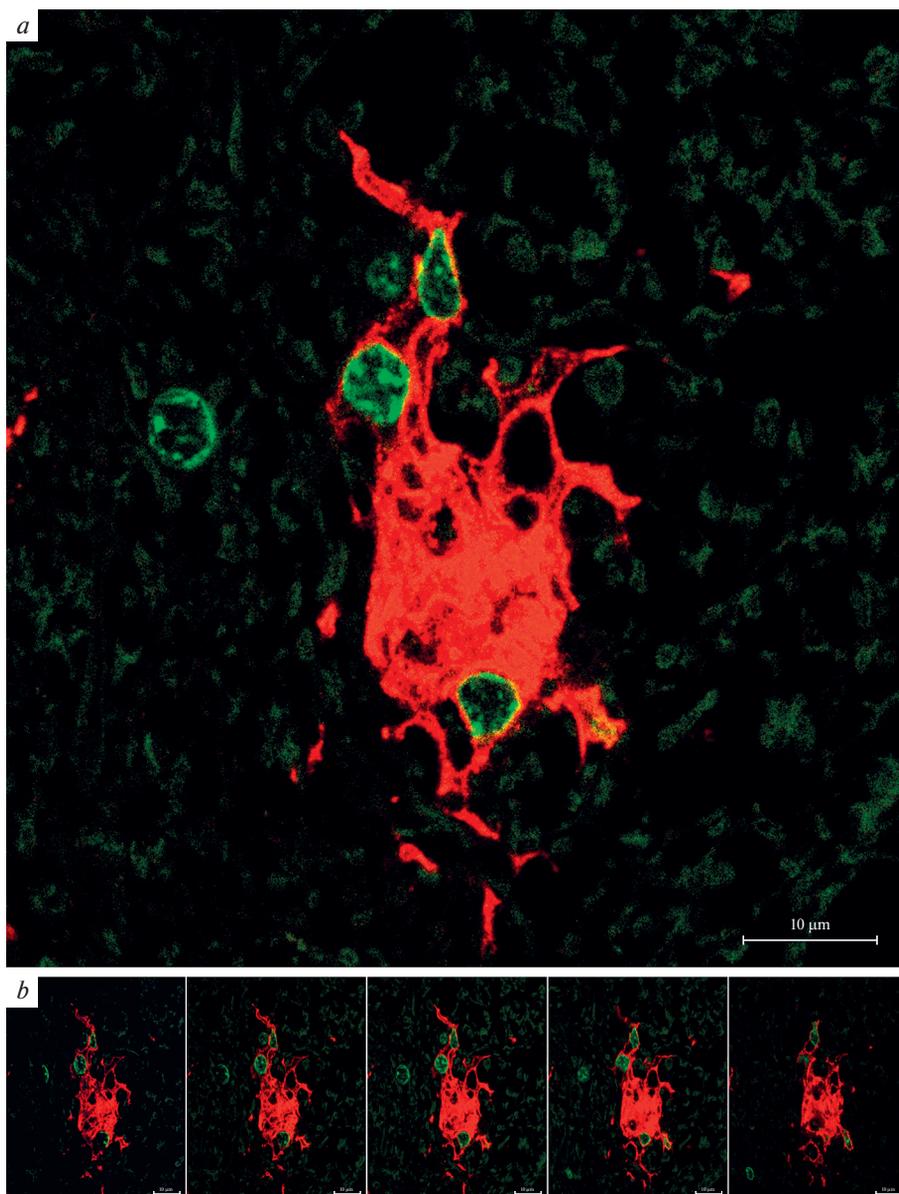
равномерно распределены в области тонкого клиновидного пучка и дорсального кортикоспинального тракта (*fasciculus gracilis*, *fasciculus cuneatus*, *tractus corticospinalis dorsalis*) (рис. 4а). При старении крыс микроглиоциты данной области проявляют морфологические признаки реактивных изменений. Иммунопозитивные клетки обладают гипертрофированным клеточным телом и короткими толстыми отростками. Отмечено присутствие лишенных отростков клеток увеличенного размера с тонким ободком цитоплазмы и крупными вакуолями. Такие клетки концентрируются преимущественно в области тонкого пучка СМ (рис. 4b). Единичные гипертрофированные микроглиоциты присутствуют также в области дорсального кортикоспинального тракта. Также в области дорсального канатика СМ идентифицируются агрегаты иммунопозитивных клеток (до 450 мкм<sup>2</sup>), образованные 3–6 клетками.

В настоящем исследовании установлено, что у стареющих животных количество иммунопозитивных клеток в дорсальном канатике СМ возрастает в 2 раза по сравнению с группой молодых крыс ( $p < 0.05$ ) (рис. 1а), а площадь, занимаемая Iba-1-иммунопозитивными клетками, возрастает более чем в 3 раза ( $p < 0.05$ ) (рис. 1b). Также отмечено, что при старении почти в 2 раза возрастает площадь, занимаемая Iba-1-иммунопозитивными клетками в области вентрального канатика СМ крыс ( $p < 0.05$ ) (рис. 1b).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

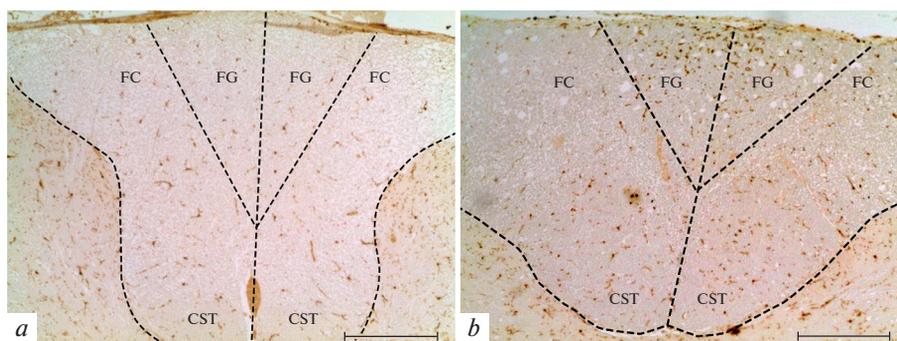
Старение оказывает глубокое влияние на структуру и функции нервной системы. Известно, что возрастные изменения ЦНС затрагивают как нейрональные элементы, так и глиальные. В многочисленных работах, посвященных старению, отмечено, что среди глиальных клеток головного мозга наиболее значительные изменения претерпевает микроглия [13, 15–17]. Исследования микроглии при старении ЦНС показали, что количество клеток и доля гипертрофированной микроглии были пропорциональны возрасту [7, 26, 27]. Установлено, что при старении в головном мозге снижается фагоцитарная функция микроглии [28, 29].

Сравнительные исследования особенностей микроглии головного и СМ в норме, при повреждениях и различных заболеваниях показывают, что клетки микроглии СМ значительно отличаются от микроглиоцитов головного мозга как морфо-



**Рис. 3.** Клеточный агрегат, образованный Iba-1-иммунопозитивными клетками в вентральном белом веществе спинного мозга 18-месячной крысы. Иммунофлуоресцентная реакция на белок Iba-1 (RRX – красная флуоресценция) с докраской ядер клеток (SYTOX Green – зеленая флуоресценция). Конфокальная лазерная микроскопия. Объединенная реконструкция (a) по серии из пяти плоскостных изображений, составляющих Z-стек, интервал которого по оси z составляет 0.2 мкм (b). Масштабный отрезок – 10 мкм.

логически, так и функционально [18, 30]. В отличие от головного мозга, реактивные изменения микроглии СМ при старении изучены недостаточно. В настоящей работе исследовали микроглиоциты как серого, так и белого вещества СМ крыс в возрасте 4 и 18 мес. При проведении иммуногистохимического выявления микро-



**Рис. 4.** Распределение Iba-1-иммунопозитивных клеток в дорсальном канатике СМ крыс в возрасте 4 (а) и 18 месяцев (b). FG – тонкий пучок, FC – клиновидный пучок, CST – дорсальный кортикоспинальный тракт. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1. Масштабный отрезок – 200 мкм.

глиоцитов молодых и стареющих животных не было отмечено изменения количества Iba-1-содержащих клеток в области серого вещества СМ. Морфологические характеристики клеток микроглии в сером веществе СМ с возрастом также существенно не изменяются, лишь единичные иммунопозитивные клетки СМ 18-месячных крыс проявляют признаки активации. Амебоидные клетки отсутствуют как в дорсальном, так и в вентральном сером веществе СМ стареющих животных. Подобную картину наблюдали при анализе возрастных изменений микроглии спинного мозга у собак [20].

При исследовании СМ молодых и стареющих крыс с применением иммуногистохимического выявления ядерного белка нервных клеток (NeuN) было установлено, что количество нейронов в шейном отделе СМ крыс не меняется при старении, что дополняет результаты исследований, выполненных на животных, относящихся к другим видам [20, 31]. Так как количественный анализ нейронов в СМ крыс не выявил изменения числа клеток при старении, то найденное нами присутствие незначительного числа гипертрофированных (реактивно измененных) микроглиоцитов в сером веществе СМ стареющих крыс не связано с гибелью нейронов и их отростков. Однако стоит учесть, что такая микроглия может способствовать развитию процессов нейродегенерации на более поздних сроках онтогенеза. Известно, что активированная микроглия вносит значительный вклад в патогенез нейродегенеративных заболеваний путем синтеза различных цитотоксических молекул, свободных радикалов, провоспалительных простагландинов и цитокинов [25, 32]. Вероятно, дальнейшее старение животных может привести к росту доли активированных микроглиоцитов и гибели нейронов.

При сравнении распределения и структурных особенностей микроглиоцитов 4- и 18-месячных крыс были отмечены значительные реактивные изменения микроглии белого вещества СМ крыс. Установлено, что плотность распределения клеток микроглии в области дорсального канатика СМ у стареющих животных превышает аналогичный показатель 4-месячных крыс более чем в 2 раза, а площадь, занимаемая Iba-1-иммунопозитивными клетками в этой области, возрастает при старении более чем в 3 раза. Дорсальный канатик СМ является важным восходящим путем передачи сенсорной информации. Центральные отростки чувствительных нейронов в составе задних корешков входят в СМ и, образуя дорсальный канатик, обеспечивают дальнейшее распространение сенсорных сигналов по восходящим трактам к различным отделам головного мозга. Кроме того, в области дорсального белого ве-

щества СМ крыс располагается корково-спинномозговой путь, являющийся ключевым элементом контроля двигательных функций и контроля сенсорной обратной связи на уровне СМ [33, 34]. Данный нисходящий тракт СМ является дополнительным уровнем сенсомоторной интеграции [35, 36]. Увеличение количества реактивной микроглии в области проводящих путей СМ может свидетельствовать о начале патологических изменений со стороны сенсорной и двигательной систем.

В работах, посвященных старению головного мозга, авторы связывают реактивные изменения микроглии с нарушениями процессов миелинизации. Обнаруженное в настоящем исследовании увеличение количества реактивной микроглии в области дорсального канатика (клиновидного, тонкого пучка и дорсального кортикоспинального тракта) в СМ 18-месячных крыс также может свидетельствовать о начале демиелинизации аксонов сенсорной системы. Можно предположить, что при старении фрагменты миелиновых оболочек проводящих трактов накапливаются в дорсальном белом веществе и фагоцитируются клетками микроглии. Известно, что в сенсомоторной системе (дорсальный канатик) стареющих крыс уже к 12 мес. постнатального развития наблюдаются выраженные изменения в миелиновой оболочке аксонов, проявляющиеся волнообразным разделением миелиновых слоев, разрушением миелина, вздутием аксонов и участками локальной демиелинизации [37].

Мы полагаем, что активация микроглиоцитов дорсального белого вещества может быть обусловлена не только процессами демиелинизации чувствительных афферентов, но также гибелью сенсорных нейронов спинномозгового ганглия, обусловленной старением. Сокращение числа нейронов спинномозгового ганглия с возрастом ранее было отмечено у крыс и кроликов [38, 39]. В исследованиях, выполненных на мышах, установлено, что проприоцептивные сенсорные нейроны, афференты которых образуют тонкий и клиновидный пучки СМ, дегенерируют при старении [40]. В нашей предыдущей работе было отмечено, что в спинномозговом ганглии крыс в возрасте 18 месяцев происходит активация клеток-сателлитов [41], что свидетельствует о метаболических изменениях, происходящих в чувствительных нейронах при старении, и начале дегенеративных изменений их центральных афферентов.

Отмеченное в настоящей работе преобладание реактивной микроглии и клеток с крупными вакуолями, предположительно содержащими липиды, в тонком пучке СМ по сравнению с клиновидным пучком свидетельствует о более активном процессе демиелинизации в нижележащих (грудном и поясничном) сегментах СМ стареющих крыс по сравнению с шейным отделом.

В настоящем исследовании в вентральном белом веществе СМ стареющих животных отмечено значительное увеличение площади, занимаемой микроглиоцитами, по сравнению с группой молодых крыс. При этом не наблюдается увеличения количества клеток микроглии. Такой факт объясняется присутствием в области вентрального белого вещества СМ крупных скоплений (агрегатов) микроглиоцитов, впервые идентифицированных в настоящем исследовании. Их образование, вероятно, связано с демиелинизацией аксонов, образующих передний кортикоспинальный тракт. Нами не было отмечено микроглиальной реакции в латеральных областях белого вещества, где также проходят нисходящие двигательные тракты. Исследование, выполненное на более старых крысах (30 месяцев), показало значительное увеличение числа микроглиоцитов как в тонком пучке дорсального белого вещества СМ, так и в латеральном и вентральном белом веществе [19]. По-видимому, по мере старения патологические изменения сенсомоторных путей прогрессируют и захватывают дорсальные, латеральные и вентральные тракты СМ.

В последние годы особое внимание уделяется участию микроглиоцитов головного мозга в фагоцитозе миелина и участию микроглиоцитов в процессах де- и ре-

миелинизации при нейродегенеративных заболеваниях и повреждениях головного мозга. Такие исследования выполняются с целью формирования терапевтических подходов для модуляции фагоцитоза и ремиелинизации [42–44]. Исследования, касающиеся участия микроглиоцитов СМ в фагоцитозе миелина и ремиелинизации при старении, малочисленны [45]. Известно, что утилизация миелиновых фрагментов имеет решающее значение для процесса ремиелинизации [46]. Избыточное накопление неразрушенных фрагментов миелина во внеклеточном пространстве после длительной демиелинизации ингибирует дифференцировку предшественников олигодендроцитов и препятствует ремиелинизации [43, 46–48]. Можно предположить, что выявленное нами накопление микроглиоцитов в области белого вещества СМ при старении в некоторой степени связано с протекающими процессами ремиелинизации. Кроме того, известно, что микроглиоциты способны принимать участие в процессах ремиелинизации аксонов путем синтеза факторов роста для созревания предшественников олигодендроцитов в дополнение к удалению ингибирующих фрагментов миелина.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе выявлены возрастные изменения клеток микроглии СМ крыс и определены региональные особенности обнаруженных изменений. Сравнительное исследование белого и серого вещества СМ показало, что реактивные изменения микроглиоцитов более характерны для белого вещества. Предположительно, это связано с активными процессами де- и ремиелинизации нервных волокон СМ. Впервые показано, что у стареющих животных наибольшие изменения претерпевает микроглия дорсального и вентрального канатика. В этих областях выявлены также скопления (агрегаты) реактивных микроглиоцитов. Проводящие пути вентрального и дорсального канатика СМ обеспечивают восприятие сенсорной информации от внешних раздражителей, осуществляют ее оценку и определяют последующую двигательную активность. Полученные результаты свидетельствуют о возможном вкладе микроглии в патогенез сенсорных нарушений, связанных со старением.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А.К., Д.Э.К. разработали план эксперимент, провели анализ материала, участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и написании текста статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J* (2018) Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 21: 1359–1369.  
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
2. *Xu Y, Jin MZ, Yang ZY, Jin WL* (2021) Microglia in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 16: 270–280.  
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.290881>

3. *Yoo H-J, Kwon M-S* (2021) Aged microglia in neurodegenerative diseases: microglia lifespan and culture methods. *Front Aging Neurosci* 13: 766267.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.766267>
4. *Tremblay MÈ* (2011) The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies. *Neuron Glia Biol* 7(1): 67–76.  
<https://doi.org/10.1017/S1740925X12000038>
5. *Colonna M, Butovsky O* (2017) Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35: 441–468.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
6. *Kolos EA, Korzhevskii DE* (2020) Spinal cord microglia in health and disease. *Acta Naturae* 12(1): 4–17.  
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.10934>
7. *Damani MR, Zhao L, Fontainhas AM, Amaral J, Fariss RN, Wong WT* (2011). Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell* 10: 263–276.  
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00660.x>
8. *Njie EG, Boelen E, Stassen FR, Steinbusch HW, Borchelt DR, Streit WJ* (2012). Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging* 33: 195 e1–e12.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.008>
9. *Hart AD, Wytenbach A, Perry VH, Teeling JL* (2012) Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences. *Brain Behav Immun* 26: 754–765.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.11.006>
10. *Nikodemova M, Small AL, Kimyon RS, Watters JJ* (2016) Age-dependent differences in microglial responses to systemic inflammation are evident as early as middle age. *Physiol Genomics* 48(5): 336–344.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00129.2015>
11. *Stojiljkovic MR, Ain Q, Bondeva T, Heller R, Schmeer C, Witte OW* (2019) Phenotypic and functional differences between senescent and aged murine microglia. *Neurobiol Aging* 74: 56–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.10.007>
12. *Seidler RD, Bernard JA, Burutolu TB, Fling BW, Gordon MT, Gwin JT, Kwak Y, Lipps DB* (2010) Motor control and aging: links to age-related brain structural, functional, and biochemical effects. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 721–733.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.10.005>
13. *Streit WJ, Xue Q-S* (2010) The brain's aging immune system. *Aging Dis* 1(3): 254–261.
14. *Tomasi D, Volkow ND* (2012) Aging and functional brain networks. *Mol Psychiatry* 17: 549–558.  
<https://doi.org/10.1038/mp.2011.81>
15. *von Bernhardi R, Eugenin-von Bernhardi L, Eugenin J* (2015) Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 7: 124.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00124>
16. *Salas IH, Burgado J, Allen NJ* (2020) Glia: victims or villains of the aging brain? *Neurobiol Dis* 143: 105008.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105008>
17. *Costa J, Martins S, Ferreira PA, Cardoso AMS, Guedes JR, Peça J, Cardoso AL* (2021). The old guard: Age-related changes in microglia and their consequences. *Mech Ageing Dev* 197: 111512.  
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111512>
18. *Xuan FL, Chithanathan K, Lilleväli K, Yuan X, Tian L* (2019) Differences of microglia in the brain and the spinal cord. *Front Cell Neurosci* 14(13): 504.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00504>
19. *Kullberg S, Aldskogius H, Ulfhake B* (2001) Microglial activation, emergence of ED1-expressing cells and clusterin upregulation in the aging rat CNS, with special reference to the spinal cord. *Brain Res* 899: 169–186.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02222-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02222-3)
20. *Chung JY, Choi JH, Lee CH, Yoo KY, Won MH, Yoo DY, Kim DW, Choi SY, Youn HY, Moon SM, Hwang IK* (2010) Comparison of ionized calcium-binding adapter molecule 1-immunoreactive microglia in the spinal cord between young adult and aged dogs. *Neurochem Res* 35: 620–627.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-009-0108-4>
21. *Lee S, Wu Y, Shi XQ, Zhang J* (2015) Characteristics of spinal microglia in aged and obese mice: potential contributions to impaired sensory behavior. *Immunity & Ageing* 12: 22.  
<https://doi.org/10.1186/s12979-015-0049-5>
22. *Ritzel RM, Patel AR, Pan S, Crapser J, Hammond M, Jellison E, McCullough LD* (2015) Age- and location-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging* 36: 2153–2163.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.02.016>
23. *Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP* (2015) Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde *Eur J His*

- tochem 59(3): 233–237.  
<https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530>
24. *Kongsui R, Beynon SB, Johnson SJ, Walker FR* (2014) Quantitative assessment of microglial morphology and density reveals remarkable consistency in the distribution and morphology of cells within the healthy prefrontal cortex of the rat. *J Neuroinflamm* 11: 182.  
<https://doi.org/10.1186/s12974-014-0182-7>
  25. *Streit WJ, Xue QS, Tischer J, Bechmann I* (2014) Microglial pathology. *Acta Neuropathol Commun* 2: 142.  
<https://doi.org/10.1186/s40478-014-0142-6>
  26. *Tremblay ME, Zettel ML, Ison, JR, Allen PD, Majewska AK* (2012) Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. *Glia* 60: 541–558.  
<https://doi.org/10.1002/glia.22287>
  27. *Shahidehpour RK, Higdon RE, Crawford NG, Nelner JH, Ighodaro ET, Patel E, Price D, Nelson PT, Bachstetter AD* (2021) Dystrophic microglia are associated with neurodegenerative disease and not healthy aging in the human brain. *Neurobiol Aging* 99: 19–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.12.003>
  28. *Bliederhaeuser C, Grozdanov V, Speidel A, Zondler L, Ruf W P, Bayer H, Kiechle M, Feiler MS, Freischmidt A, Brenner D, Witting A, Hengerer B, Fändrich M, Ludolph AC, Weishaupt JH, Gillingardon F, Danzer KM* (2016) Age-dependent defects of alpha-synuclein oligomer uptake in microglia and monocytes. *Acta Neuropathol* 131: 379–391.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1504-2>
  29. *Yanguas-Casás N, Crespo-Castrillo A, Arevalo MA, Garcia-Segura LM* (2020) Aging and sex: Impact on microglia phagocytosis. *Aging Cell* 19(8): e13182.  
<https://doi.org/10.1111/acel.13182>
  30. *Zhang B, Gensel JC* (2014) Is neuroinflammation in the injured spinal cord different than in the brain? Examining intrinsic differences between the brain and spinal cord. *Exp Neurol* 258:112–120.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.007>
  31. *Maxwell N, Castro RW, Sutherland NM, Vaughan KL, Szarowicz MD, de Cabo R, Mattison A, Valdez G* (2018)  $\alpha$ -Motor neurons are spared from aging while their synaptic inputs degenerate in monkeys and mice. *Aging Cell* 17: e12726.  
<https://doi.org/10.1111/acel.12726>
  32. *Azam S, Haque M, Kim IS, Choi DK* (2021) Microglial turnover in ageing-related neurodegeneration: therapeutic avenue to intervene in disease progression. *Cells* 10(1): 150.  
<https://doi.org/10.3390/cells10010150>
  33. *Carvalho WA, Bahia CP, Teixeira JC, Gomes-Leal W, Pereira A* (2017) Interlimb Dynamic after Unilateral Focal Lesion of the Cervical Dorsal Corticospinal Tract with Endothelin-1. *Front Neuroanat* 11: 89.  
<https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00089>
  34. *Bieler L, Grassner L, Zaubmair P, Kreutzer C, Lampe L, Trinka E, Marschallinger J, Aigner L, Couillard-Despres S* (2018) Motor deficits following dorsal corticospinal tract transection in rats: voluntary versus skilled locomotion readouts. *Heliyon* 4: e00540.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00540>
  35. *Moreno-López Y, Olivares-Moreno R, Cordero-Erausquin M, Rojas-Piloni G* (2016) Sensorimotor Integration by Corticospinal System. *Front Neuroanat* 10: 24.  
<https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00024>
  36. *Alam M, Garcia-Alias G, Jin B, Keyes J, Zhong H, Roy RR, Gerasimenko Y, Lu DC, Edgerton VR* (2017) Electrical neuromodulation of the cervical spinal cord facilitates forelimb skilled function recovery in spinal cord injured rats. *Exp Neurol* 291: 141–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.02.006>
  37. *Xie F, Zhang JC, Fu H, Chen J* (2013) Age-related decline of myelin proteins is highly correlated with activation of astrocytes and microglia in the rat CNS. *Int J Mol Med* 32: 1021–1028.  
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1486>
  38. *Bergman E, Ulfhake B* (1998) Loss of primary sensory neurons in the very old rat: neuron number estimates using the disector method and confocal optical sectioning. *J Comp Neurol* 396: 211–222.
  39. *Pannese E, Sartori P, Martinelli C, Ledda M* (1998) Age-related decrease in the overall extent of perikaryal projections in rabbit spinal ganglion neurons. *Neurosci Lett* 254: 177–179.
  40. *Vaughan SK, Stanley OL, Valdez G* (2017) Impact of aging on proprioceptive sensory neurons and intrafusal muscle fibers in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 72(6): 771–779.  
<https://doi.org/10.1093/gerona/glw175>
  41. *Kolos EA, Korzhhevskii DE* (2020) Immunohistological detection of active satellite cells in rat dorsal root ganglia after parenteral administration of lipopolysaccharide and during aging. *Bull Exp Biol Med* 169(5): 665–668.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04950-2>

42. *Thériault P, Rivest S* (2016) Microglia: senescence impairs clearance of myelin debris. *Current Biol* 26(16): R772–R775.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.066>
43. *Pinto MV, Fernandes A* (2020) Microglial phagocytosis-rational but challenging therapeutic target in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 21(17): 5960.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21175960>
44. *Sen MK, Mahns DA, Coorsen JR, Shortland PJ* (2022) The roles of microglia and astrocytes in phagocytosis and myelination: Insights from the cuprizone model of multiple sclerosis. *Glia* 70(7): 1215–1250.  
<https://doi.org/10.1002/glia.24148>
45. *Rawji KS, Kappen J, Tang W, Teo W, J PlemelR, Stys PK, Yong VW* (2018) Deficient surveillance and phagocytic activity of myeloid cells within demyelinated lesions in aging mice visualized by ex vivo live multiphoton imaging. *J Neurosci* 38 (8): 1973–1988.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2341-17.2018>
46. *Lampron A, Larochelle A, Laflamme N, Prefontaine P, Plante MM, Sanchez MG, Yong VW, Stys PK, Tremblay MÉ, Rivest S* (2015) Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *J Exp Med* 212 (4): 481–495.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20141656>
47. *Lloyd AF, Miron VE* (2019) The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system. *Nat Rev Neurol* 15(8): 447–458.  
<https://doi.org/10.1038/s41582-019-0184-2>
48. *Shen K, Reichelt M, Kyauk R, Ngu H, Shen Y, Foreman O, Modrusan Z, Friedman BA, Sheng M, Yuen TJ* (2021) Multiple sclerosis risk gene *Mertk* is required for microglial activation and subsequent remyelination. *Cell Rep* 34(10): 108835.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108835>

### Age-Related Changes of the Rat Spinal Cord Microglia

E. A. Kolos<sup>a</sup>, \* and D. E. Korzhevskii<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

\**e-mail: koloselena1984@yandex.ru*

The aim of this study was to evaluate changes of microglial cells in various regions of the cervical spinal cord in young (4 months) and aging (18 months) rats using immunohistochemical markers. Antibodies to the calcium-binding protein Iba-1 were used to identify microglial cells. To assess the change in the number of spinal cord neurons with aging, antibodies to the neuronal nuclear antigen (NeuN) were used. In this work, regional differences in the reaction of microglia during aging were revealed. It has been established that reactive changes of aging rats microglia are more apparent in the white matter rather than in the gray matter of the spinal cord. This fact is probably explained by the active processes of de- and remyelination of spinal cord nerve fibers, which are observed at the late stages of ontogenesis. It was noted that the microglia of the dorsal and ventral funiculus undergo the greatest changes. It is known that these pathways provide the perception of sensory information from external stimuli, the assessment of its intensity, type, and subsequent motor activity. The clusters (aggregates) of activated microglia, previously not described by researchers, were identified by us in the region of the dorsal and ventral funiculi of the spinal cord. Presumably they are involved in the processes of demyelination. The results obtained in the present study support the involvement of microglia in sensory disabilities associated with aging.

**Keywords:** aging, microglia, spinal cord, immunohistochemistry, Iba-1 protein

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЛПС СТИМУЛИРУЕТ АККУМУЛЯЦИЮ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ  
И ФОРМИРОВАНИЕ ЛИПИДНЫХ ТЕЛЕЦ В КЛЕТКАХ  
НЕЙРОНАЛЬНОЙ ЛИНИИ РС12: РОЛЬ ДАУН-РЕГУЛЯЦИИ  
КАРНИТИН-ПАЛЬМИТОИЛТРАНСФЕРАЗЫ-1  
И СНИЖЕНИЯ ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ**

© 2022 г. С. Д. Николаева<sup>1</sup>, Е. М. Фок<sup>1</sup>, Р. Г. Парнова<sup>1</sup>, \*

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

*\*E-mail: rimma\_parnova@mail.ru*

Поступила в редакцию 24.05.2022 г.

После доработки 15.06.2022 г.

Принята к публикации 15.06.2022 г.

Хорошо известно, что воспаление и окислительный стресс в различных типах клеток вызывают образование липидных телец (ЛТ), в которых депонируются жирные кислоты в составе триацилглицеринов (ТАГ) и/или эфиров холестерина. Этот метаболический сдвиг имеет значение для защиты клеток от токсикации избытком липидов или их окисленных производных, образующихся при различных типах стрессорных воздействий, включая окислительный стресс. Эффект бактериального ЛПС на формирование ЛТ в структурах ЦНС был исследован, главным образом, на клетках микроглии, однако его влияние на липидный метаболизм нейрональных клеток, потенциально ассоциированный с формированием ЛТ, не исследовано ни на клеточных линиях, ни на первичной культуре нейронов. Задачей данной работы, объектом которой служила нейрональная линия клеток РС12, широко используемая в исследованиях механизмов нейровоспаления и нейродегенерации, послужило изучение влияния ЛПС на формирование ЛТ, аккумуляцию нейтральных липидов, метаболизм основных липидных классов и выяснение возможного механизма, опосредующего данные эффекты. Инкубация клеток РС12 с ЛПС в течение 24 ч приводила к значительному накоплению ЛТ и увеличению содержания ТАГ. Этомоксир, ингибитор карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 (СРТ1), также приводил к увеличению абсолютного количества ТАГ. Для выяснения метаболических путей накопления ТАГ, клетки РС12 прединкубировали с [<sup>3</sup>H]-олеиновой кислотой, а затем исследовали включение радиоактивной метки в основные классы липидов. ЛПС вызывал повышение радиоактивности ТАГ и свободной олеиновой кислоты, сопровождающееся значительным торможением ее окисления и снижением радиоактивности в фосфолипидах. Инкубация клеток с ЛПС приводила к снижению экспрессии СРТ1. Полученные данные свидетельствуют о том, что в клетках РС12 ЛПС вызывает снижение окисления жирных кислот, уменьшение экспрессии СРТ1, ключевого фермента переноса жирных кислот в митохондрии, что приводит к секвестрации избыточных жирных кислот в ТАГ и формированию ЛТ. Подобный механизм в условиях действия бактериального патогена является, по всей вероятности, стратегией выживания клетки, защищающий ее от липотоксичности.

*Ключевые слова:* клетки РС12, липополисахарид, липидные гранулы, триацилглицерины, окисление жирных кислот, карнитин-пальмитоилтрансфераза 1

**DOI:** 10.31857/S086981392207007X

За последнее время наши представления о действии бактериального липополисахарида (ЛПС) на нервную систему претерпели значительные изменения. Еще недавно считалось, что патологические эффекты ЛПС на клетки нервной системы могут осуществляться только при наличии в организме специфических инфекций. Однако появились данные о том, что нарушение проницаемости кишечного эпителия, связанное с различными патологиями и старением, может приводить к попаданию в системный кровоток ЛПС и других нейротоксичных соединений. Они проникают через гематоэнцефалический барьер в паренхиму мозга и приводят к развитию хронического воспаления ЦНС и нейродегенерации, в том числе к болезни Альцгеймера [1]. Количество ЛПС в структурах гиппокампа и неокортексе оказалось на порядки выше у больных болезнью Альцгеймера по сравнению со здоровыми людьми [2]. В связи с этим исследования механизмов развития нейродегенерации, стимулируемого бактериальными воспалительными агентами, приобрело в настоящее время особую актуальность.

Клетки нейрональной линии PC12 широко используются как клеточные модели в исследованиях механизмов нейровоспалительного действия ЛПС. Этот тип клеток экспрессирует TLR4, рецепторы ЛПС [3–5], и как нами было показано ранее, запуск сигнального каскада обеспечивается передислокацией TLR4 в область липидных рафтов [3]. Многочисленными работами установлено, что в основе повреждающего действия ЛПС на клетки PC12, независимо от степени их дифференцировки, является усиление генерации активных форм кислорода (АФК), снижение активности ферментов антиоксидантной системы, развивающаяся дисфункция митохондрий, образование провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ ), стресс эндоплазматического ретикулума, что в конечном итоге приводит к снижению жизнеспособности клеток и апоптозу [4, 6–8]. На дифференцированных клетках PC12, помимо вышеперечисленных эффектов, ЛПС вызывает также снижение роста нейритов [9, 10].

Одним из проявлений воспалительного действия ЛПС, обнаруженного в разных типах клеток, является изменение метаболизма нейтральных липидов, приводящее к усилению депонирования жирных кислот в составе триацилглицеринов (ТАГ) и/или эфиров холестерина в липидных тельцах (ЛТ) [11–13] – особых органеллах, структурно-функционально связанных с эндоплазматическим ретикулумом и митохондриями. ЛТ играют не только важнейшую роль в регуляции липидного и энергетического метаболизма клетки, продукции эйкозаноидов, но и являются структурами, защищающими клетку от токсикации избытком липидов или их производных (жирных кислот, церамида и других липофильных веществ), образующихся при различных типах стрессорных воздействий, включая окислительный стресс [14–16]. С нарушением биогенеза ЛТ связаны многочисленные патологии – ожирение, атеросклероз, стеатоз печени и нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Паркинсона, Альцгеймера и Хантингтона, а также боковой амиотрофический склероз [17].

В недавних исследованиях установлено, что ЛТ могут формироваться в различных типах клеток нервной системы – микроглии, астроцитах, эпендимных клетках [14, 18, 19], а в патологических ситуациях и в нейронах [20]. Для нормально функционирующих нейронов в отличие от других типов клеток не характерно формирование ЛТ, и их аккумуляция является маркером патологического процесса [21]. Так, на моделях болезни Паркинсона показано, что с усилением биогенеза ЛТ связано накопление альфа-синуклеина в дофаминергических нейронах [20]. ЛТ присутствуют в глиальных клетках, где выполняют роль особых антиоксидантных органелл, аккумулирующих чувствительные к окислению полиненасыщенные жирные кислоты или уже окисленные производные, защищая нейроны от повреждающего действия АФК и препятствуя развитию нейродегенерации [21]. Показа-

но, что при гиперактивации нейронов, которая сопровождается окислительным стрессом, происходит накопление ЛТ в астроцитах за счет экспорта окисленных липидов из нейронов в виде АроЕ-позитивных липидных частиц, что обеспечивает нейропротекцию [22, 23]. Стимулом для переноса липидов из нейронов в ЛТ глии является продукция АФК в нейронах [24].

Эффект бактериального ЛПС на изменение липидного метаболизма в структурах ЦНС был исследован, главным образом, на клетках микроглии. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что ЛПС вызывает увеличение числа и размеров ЛТ, а также усиление экспрессии белков, локализованных на их поверхности, которые регулируют формирование ЛТ и липолиз аккумулированных липидов [25, 26]. В клетках микроглии ЛПС инициирует высвобождение арахидоновой кислоты из липидов ЛТ для последующего синтеза провоспалительных липидных медиаторов [26]. Однако влияние ЛПС на липидный метаболизм нейрональных клеток, потенциально ассоциированный с формированием ЛТ, не исследовано ни на клеточных линиях, ни на первичной культуре нейронов. В связи с этим задачей настоящей работы, объектом которой служила нейрональная линия клеток РС12, послужило изучение влияния ЛПС на формирование ЛТ, аккумуляцию нейтральных липидов, метаболизм основных липидных классов и выяснение возможного механизма, опосредующего данные эффекты.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Реактивы:* липополисахарид *E. coli* (серотип 0111: В4), этомоксир, олеиновая кислота, стандарты липидов (триолеилглицерин, холестерин, эфиры холестерина) – Sigma Chemicals (США); нильский красный – Invitrogen (США); пенициллин и стрептомицин – Serva (Германия); инкубационная среда DMEM с L-глутамином, сыворотки крови лошади и плодов коровы – фирма Биолот (Россия); [9,10-<sup>3</sup>H(N)] олеиновая кислота – Perkin Elmer (США).

### *Культивирование клеток и определение их жизнеспособности*

Опыты проводили на нейрональной клеточной линии РС12. Клетки выращивали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM с L-глутамином, содержащей 10% сыворотки крови плодов коровы, 5% сыворотки крови лошади, 50 мкг/мл стрептомицина и 50 ед/мл пенициллина G. Ростовую среду меняли каждые 2–3 дня. Для оценки действия ЛПС на метаболизм липидов посев клеток осуществляли в 24-луночные планшеты в количестве 2 × 10<sup>5</sup> клеток/лунку. Через сутки в опытные лунки добавляли ЛПС в количестве 0.5 мг/мл и инкубировали клетки в течение 24 ч. Оценку жизнеспособности клеток проводили МТТ-тестом. Для этого клетки рассаживали в 96-луночные планшеты с плотностью 5 × 10<sup>4</sup> клеток на лунку с ЛПС или без него и за 2 ч до окончания 24-часовой инкубации добавляли МТТ-реагент в конечной концентрации 0.5 мг/мл. Клетки лизировали в 50%-ном растворе диметилформамида в 0.05 N HCl. Оптическую плотность раствора измеряли на планшетном ридере при 570 нм, результаты выражали как процент к контролю после вычитания фоновой оптической плотности.

### *Конфокальная микроскопия*

Клетки в количестве 10<sup>5</sup>/500 мкл среды переносили в камеру для конфокального микроскопа. Концентрированный раствор нильского красного в ДМСО в концентрации 1 мг/мл разбавляли в 1000 раз культуральной средой, 100 мкл этого раствора добавляли в камеру микроскопа за 5–10 мин до визуализации. Микрофотографии

получали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP-II (Leica-Microsystems, Германия). Флуоресценцию возбуждали при  $\lambda$  488 нм, регистрируя испускаемый свет при  $\lambda$  500–570 нм, объектив  $\times 20$  с масляной иммерсией. Обсчет флуоресценции осуществляли с помощью программы ImageJ.

#### *Экстракция липидов и определение абсолютного количества ТАГ*

Клетки инкубировали с этанолом в концентрациях 5, 20 или 100 мкМ, с 25 мкМ олеиновой кислоты или с 0.5 мкг/мл ЛПС в течение суток. В контрольные лунки добавляли соответствующий объем этилового спирта, в котором были растворены этанол и олеиновая кислота. По окончании инкубации клетки промывали раствором Хенкса и подвергали экстракции смесью хлороформ–метанол в соотношении 2 : 1. Полученные липидные экстракты промывали 1/5 объема 0.75%-ного раствора KCl, центрифугировали 5 мин при 250 g, нижнюю фазу упаривали досуха, осадок липидов растворяли в 20 мкл смеси хлороформ–метанол (2 : 1) и затем наносили на хроматографическую пластинку DC-Alufolien (Merck, Германия). Хроматографию проводили в системе гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (33 : 11.3 : 1, v/v). Пластинку проявляли в 20%-ном водном растворе H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем нагревали до 150°C до проявления зон липидных классов, после чего фотографировали в стандартных условиях освещенности с помощью фотоаппарата Sony Cyber-Shot DSC-F828 (параметры съемки: F 2.5, S 60). Липиды идентифицировали с помощью соответствующих стандартов. Денситометрический анализ проводили с помощью программ ImageJ и Microsoft Office Excel. Абсолютные количества ТАГ рассчитывали, исходя из количества нанесенного на пластинку стандартного раствора ТАГ.

#### *Включение в липиды [<sup>3</sup>H]-олеиновой кислоты и оценка окисления жирных кислот*

Клетки инкубировали в течение 1 ч с 26 пмольями [9,10-<sup>3</sup>H(N)] олеиновой кислоты с удельной активностью 45.5 Ки/ммоль, затем отбирали среду, промывали раствором Хенкса, добавляли чистую инкубационную среду и ЛПС в количестве 0.5 мкг/мл. Через сутки клетки вместе со средой переносили в пробирки, центрифугировали 10 мин при 200 g, надосадочную жидкость отбирали, осадок клеток промывали раствором Хенкса, центрифугировали еще раз при тех же условиях. Из осадка клеток и супернатанта экстрагировали липиды по методу Фолча, липидный экстракт промывали 1/5 объема 0.75%-ного раствора KCl. Полученный клеточный экстракт наносили на хроматографическую пластинку DC-Alufolien, разделение липидов на классы проводили так, как описано выше. Пластинку проявляли в парах йода, после его испарения зоны, соответствующие классам липидов, вырезали и помещали в вials со сцинтилляционной жидкостью. Уровень радиоактивности измеряли на сцинтилляционном счетчике (LKB 1209/1215 Rack-Beta). В экстрактах супернатанта в полученной после расслоения фаз водной фазе измеряли уровень радиоактивности, оценивая по нему процесс окисления олеиновой кислоты.

#### *Иммуноблоттинг*

После окончания инкубации с ЛПС и удаления среды клетки лизировали гомогенизирующим буфером для нанесения проб, содержащим 50 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 100 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 1% SDS, 10% глицерина, 0.01% красителя бромфеноловый синий, и подвергали нагреванию при 100°C в течение 3 мин. Пробы разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Whatman, Германия). Мембраны обрабатывали 5%-ным раствором обезжиренного молока на TBS-Tween 20 в течение 1 ч и инкубировали в течение ночи при 4°C с соответствующим

ющими антителами против СРТ1 (Santa Cruz Biotechnology, США) (1 : 1000) и против тубулина (Cell Signalling, США) (1 : 1000). В качестве вторичных антител использовали goat anti-rabbit IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Vector, США) (1 : 3000). Для визуализации сигналов использовали ECL detection system (Thermo Scientific, США), содержание белка оценивали с помощью денситометрии и программы ImageJ. В качестве внутреннего стандарта использовали  $\alpha/\beta$ -тубулин.

### *Статистическая обработка результатов*

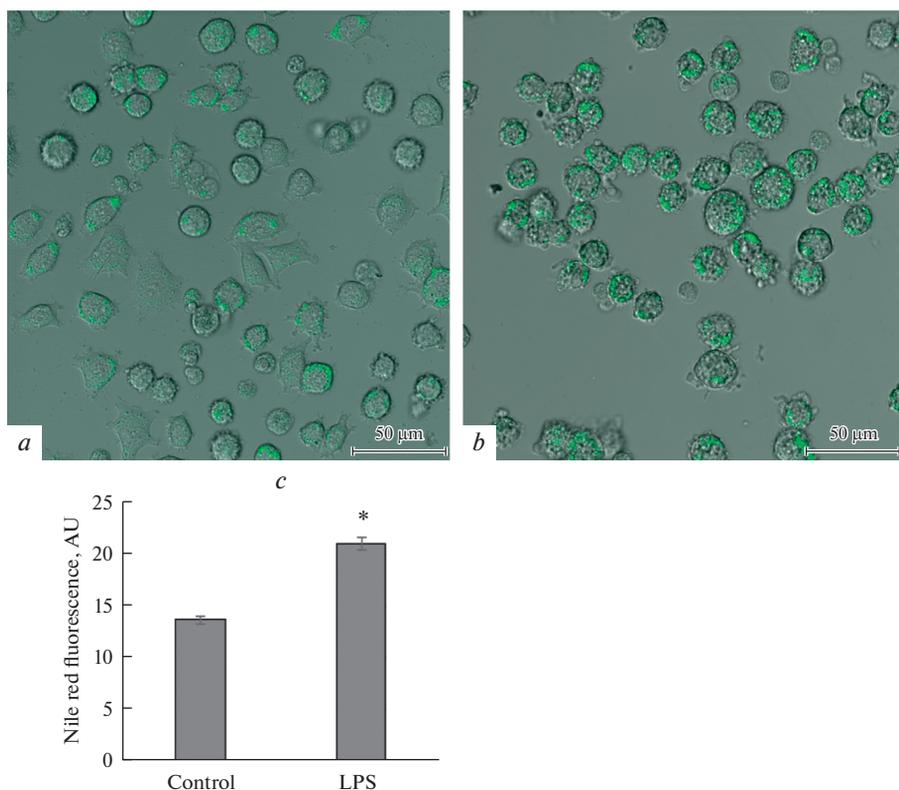
Статистическую обработку данных, представленных в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения, проводили, используя программу Microsoft Office Excel. Для определения достоверности различий применяли *t*-критерий Стьюдента для попарно-связанных величин. Там, где это было необходимо, достоверность различий между контролем и опытом определяли с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Достоверными считались отличия при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Многочисленные литературные данные о применении ЛПС на клетках линии PC12 показывают чрезвычайно широкий диапазон используемых концентраций ЛПС – от 5 до 400 мкг/мл, при этом могут отличаться как условия инкубации клеток (с сывороткой или без нее), так и используемые серотипы ЛПС или время его воздействия [4, 9]. Так же, как и наша работа, большинство исследований на PC12 с применением ЛПС в качестве триггера воспалительных реакций выполнено на недифференцированных клетках. Клетки, использованные в нашей работе, демонстрировали высокую устойчивость к ЛПС серотипа 0111: В4, оцениваемую по МТТ-тесту: массовая гибель (98%) наблюдалась при использовании дозы 1000 мкг/мл. В дозе ЛПС 500 мкг/мл жизнеспособность клеток снижалась на  $25.5\% \pm 2.9$  ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ), в связи с чем данная доза была выбрана для проведения последующих экспериментов с исследованием влияния ЛПС на липидный метаболизм.

Как в контроле, так и при действии ЛПС липидные гранулы, оцениваемые по окраске нильским красным, визуализируются в различных количествах практически во всех клетках и локализуются, главным образом, на периферии. Инкубация клеток в течение 24 ч с ЛПС приводила к значительному увеличению в цитоплазме количества и размеров липидных гранул, как одиночных, так и сгруппированных в крупные кластеры (рис. 1а, б). Учитывая свойства нильского красного, увеличение его флуоресценции при действии ЛПС в выбранном диапазоне длин волн могло вызываться накоплением как ТАГ, так и эфиров холестерина. В связи с этим необходимо было оценить роль конкретных липидных классов в накоплении липидных гранул. Для решения этой задачи из контрольных и ЛПС-стимулированных клеток были экстрагированы липиды с последующим разделением липидного экстракта на классы с помощью тонкослойной хроматографии и их количественной оценкой методом денситометрии. Результаты показали, что при действии ЛПС происходит значительное увеличение содержания ТАГ (рис. 2), но не эфиров холестерина (данные не показаны). Аналогичными эффектами обладала олеиновая кислота, использованная в качестве позитивного контроля.

Для того, чтобы понять усиливает ли аккумуляцию ТАГ снижение окисления жирных кислот, как это имеет место в некоторых типах клеток [27], клетки PC12 инкубировали с различными концентрациями этанола, ингибитора карнитинпальмитоилтрансферазы 1 (СРТ1), ключевого фермента окисления жирных кислот, обеспечивающего перенос ацил-КоА через наружную мембрану митохондрий.

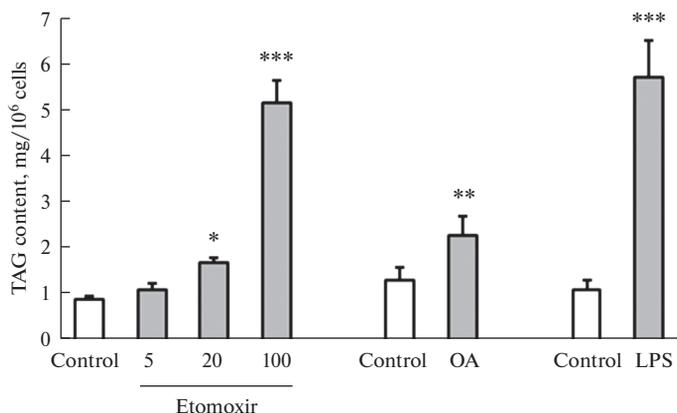


**Рис. 1.** Микрофотография клеток PC12 в контроле (a) и при действии ЛПС (b) в концентрации 0.5 мг/мл через 24 ч инкубации. Окраска нильским красным. Конфокальный микроскоп Leica TCS SP-II. Флуоресценцию возбуждали при  $\lambda$  488 нм, регистрируя испускаемый свет при  $\lambda$  500–570 нм, объектив  $\times 20$  с масляной иммерсией. c – Обсчет уровня флуоресценции нильского красного,  $n = 5$ , \*  $p < 0.05$ , парный тест Вилкоксона. AU – условные единицы.

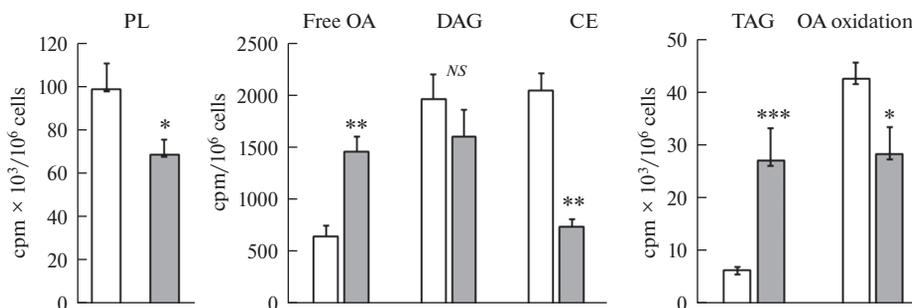
Результаты показали, что этомоксир дозозависимо увеличивал содержание ТАГ (рис. 2).

Для исследования влияния ЛПС на метаболизм липидов и окисление жирных кислот, клетки PC12 прединкубировали с [ $^3\text{H}$ ]-олеиновой кислотой, затем воздействовали ЛПС в течение 24 ч, экстрагировали липиды и измеряли уровень радиоактивности в отдельных липидных классах. Также оценивали уровень окисления олеиновой кислоты по оценке радиоактивности инкубационной среды после экстракции из нее липофильных компонентов. Результаты показали, что в клетках PC12 ЛПС приводил к увеличению радиоактивности в ТАГ и во фракции свободных жирных кислот, при этом снижал уровень радиоактивности в фосфолипидах и эфирах холестерина (рис. 3). Изменения в уровне радиоактивности диацилглицерина было статистически недостоверным. Оценка радиоактивности водной фазы внеклеточной жидкости, подвергнутой предварительной липидной экстракции, выявила достоверное снижение окисления олеиновой кислоты при действии ЛПС (рис. 3).

Поскольку СРТ1 является ферментом, лимитирующим окисление жирных кислот в митохондриях, было исследовано влияние 24-часовой инкубации с ЛПС на



**Рис. 2.** Внутриклеточное содержание ТАГ при действии разных концентраций этомоксира (5, 20 и 100 мкМ), 25 мкМ олеиновой кислоты или 0.5 мг/мл ЛПС. Клетки инкубировали в течение 24 ч, затем экстрагировали липиды и разделяли их на классы тонкослойной хроматографией. Количество ТАГ оценивали денситометрически, абсолютные количества рассчитывали, исходя из количества нанесенного на пластинку стандартного раствора ТАГ. ОА – олеиновая кислота. Данные представлены в виде среднего значения 4–6 независимых экспериментов  $\pm m$ . \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

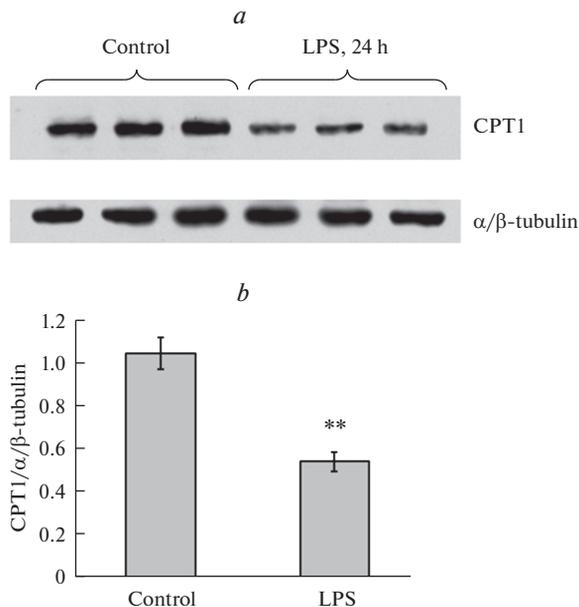


**Рис. 3.** Уровень радиоактивности в отдельных классах липидов и продуктах окисления олеиновой кислоты в контрольных и ЛПС-стимулированных клетках PC12. Прозрачные столбики – контроль, серые – ЛПС. Клетки инкубировали 1 ч в присутствии [<sup>3</sup>H]-C18: 1, отмывали и инкубировали 24 ч с 0.5 мг/мл ЛПС. PL – фосфолипиды, TAG – триацилглицерины, DAG – диацилглицерины, CE – эфиры холестерина. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm m$  4–6 независимых экспериментов. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

его экспрессию методом иммуноблоттинга. Результаты выявили значительное снижение экспрессии СРТ1 при действии ЛПС (рис. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют о том, что ЛПС в клетках нейрональной линии PC12 вызывает внутриклеточную аккумуляцию ТАГ и стимулирует формирование ЛТ. Таким образом, в отношении изменения метаболизма нейтральных липидов клетки PC12 демонстрируют “классическую” реакцию на ЛПС, свойственную различным типам клеток [11–13].



**Рис. 4.** Влияние 24-часовой инкубации с 0.5 мг/мл ЛПС на экспрессию СРТ1 в клетках PC12. *a* – Репрезентативный иммуноблот, *b* – Количественная оценка изменения экспрессии как отношение СРТ1 к  $\alpha/\beta$ -тубулину.  $n = 3$  независимых экспериментов.  $**p < 0.01$ .

Известно, что механизмы, заставляющие клетки депонировать липиды в условиях действия бактериального патогена, могут быть многообразны: уменьшение липолиза ТАГ [28], изменение экспрессии сопряженных с липазами перилипинов – белков, локализованных на поверхности ЛТ и регулирующих их формирование [26], усиление CD36-опосредованного трансмембранного переноса жирных кислот и синтеза жирных кислот с последующим включением в синтез ТАГ [11], снижение окисления жирных кислот за счет даун-регуляции транскрипционного фактора PPAR $\alpha$  и торможения экспрессии генов, обеспечивающих окисление жирных кислот в митохондриях [29], и другие. На клетках PC12 нами обнаружено, что при действии ЛПС происходит снижение окисления жирных кислот, увеличение уровня свободных жирных кислот, даун-регуляция экспрессии СРТ1, а также выявлена способность этанооксира, ингибитора СРТ1, увеличивать внутриклеточное накопление ТАГ. Совокупность этих данных указывает на то, что торможение окисления жирных кислот и их перенаправление на синтез ТАГ является причиной аккумуляции ТАГ и формирования ЛТ в данном типе клеток, что однако не исключает вовлечение и других, перечисленных выше, механизмов. Усиление формирования ЛТ, основанное на снижении окисления жирных кислот, было показано на клетках PC12 при токсическом воздействии квантовых точек (quantum dots), полупроводниковых коллоидных наночастиц [30].

Наиболее вероятной причиной снижения экспрессии СРТ1 и  $\beta$ -окисления жирных кислот в митохондриях является окислительный стресс. Торможение этих процессов в условиях окислительного стресса может являться компенсаторным механизмом, облегчающим выживание клетки, поскольку  $\beta$ -окисление жирных кислот, как известно, является одним из источников АФК. Генерируемый в ходе этого процесса ФАДН<sub>2</sub> увеличивает продукцию АФК за счет обратного потока

электронов в электрон-транспортной цепи митохондрий от комплекса II к комплексу I [15]. Нами и другими авторами было показано, что ЛПС в клетках PC12 усиливает образование АФК, снижает активность ферментов антиоксидантной системы и вызывает дисфункцию митохондрий [3, 4, 7, 31]. Известно, что в механизме действия ЛПС на клетки PC12 задействованы многочисленные молекулярные каскады, типичные для провоспалительного внутриклеточного сценария, вызванного окислительным стрессом – активация PI3K/AKT сигнального пути [32], MAP-киназ [4], JNK [33], приводящих к активации транскрипционного фактора NF-κB [34], увеличению продукции провоспалительных цитокинов, усилению экспрессии циклооксигеназы-2 [4] и индуцибельной NO-синтазы [35]. Какие сигнальные пути задействованы в снижении экспрессии SPT1 в клетках PC12 при действии ЛПС остается, однако, неизвестным. Помимо прямой регуляции экспрессии SPT1 с участием транскрипционных факторов, снижение содержания этого фермента может быть связано с изменением митохондриальной динамики, усилением фрагментации митохондрий и митофагии, что, как известно, сопровождается ЛПС-индуцированным окислительным стрессом [36, 37]. Кроме изменения уровня экспрессии, SPT1 при действии ЛПС может подвергаться и посттрансляционным модификациям продуктами окисления полиненасыщенных жирных кислот, что, как было показано, приводит к резкому снижению ее активности [38].

Еще одним механизмом внутриклеточного накопления ТАГ в клетках PC12 при действии ЛПС может быть индукция аутофагии, которая, как известно, стимулируется при действии окислительного стресса и является основным катаболическим процессом удаления из клеток поврежденных органелл, в том числе митохондрий (митофагия) [39]. Аутофагия обеспечивает передислокацию фосфолипидов из внутриклеточных органелл в аутофагосомы, где фосфолипиды подвергаются гидролизу, а высвободившиеся жирные кислоты идут на синтез ТАГ, осуществляемый ферментами, локализованными на поверхности ЛТ. ЛТ в таких процессах играют роль буферных систем, защищающих клетку от липотоксичности. На возможность участия подобного механизма в клетках PC12 указывают полученные в наших экспериментах данные о достоверном снижении уровня фосфолипидов, меченных олеиновой кислотой, при действии ЛПС, а также увеличении уровня свободных жирных кислот.

Необходимо заметить, что хотя нейрональная линия PC12, в том числе и недифференцированные клетки, широко используется как модель в исследованиях механизмов нейродегенерации, наши данные показывают, что по своему метаболическому фенотипу в отношении нейтральных липидов они похожи не на нейроны, а на нейрональные стволовые клетки. Об этом свидетельствуют следующие факты. Во-первых, в зрелых нейронах в отличие от клеток PC12 практически отсутствует окисление жирных кислот и функционирование SPT1 системы [40]. В структурах мозга эти процессы локализованы исключительно в астроцитах и нейрональных стволовых клетках [41–43]. Показано, что для нейрональных стволовых клеток субвентрикулярной зоны мозга мышей окисление жирных кислот является не только основным источником энергии, но и определяет возможность клеточной пролиферации [43]. Во-вторых, нормально функционирующие нейроны не аккумулируют нейтральные липиды, тогда как по нашим и литературным данным контрольные клетки PC12 содержат хорошо визуализируемые ЛТ [44]. В-третьих, нейроны и клетки PC12 экспрессируют различные изоформы SPT1. Идентифицированы три изоформы SPT1 – SPT1a, SPT1c и SPT1b. SPT1a и b выполняют классическую функцию этого фермента – перенос жирных кислот в виде ацилкарнитинатов через наружную мембрану митохондрий. Изоформа SPT1c экспрессируется исключительно в нейронах, локализуется не в митохондриях, а в эндоплазматическом ретикулуме и не катализирует образование ацилкарнитина [45]. Функция

ее в нейронах до сих пор малопонятна, хотя показано, что в нейронах гиппокампа СРТ1с играет защитную роль, предотвращая развитие окислительного стресса и апоптоза при воздействии  $\beta$ -амилоидного пептида [46]. Используемые в нашей работе антитела не позволяют идентифицировать изоформу СРТ1, которая экспрессируется в РС12 и чувствительна к действию ЛПС, однако по другим данным известно, что в недифференцированных клетках РС12 экспрессируется СРТ1а, локализованная в митохондриях [47]. Это согласуется с нашими данными о способности клеток РС12 окислять жирные кислоты и реагировать на ингибирование СРТ1 аккумуляцией ТАГ. Та же изоформа, СРТ1а, экспрессируется в нейрональных стволовых клетках различных зон мозга [41, 48].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в клетках РС12 ЛПС вызывает снижение окисления жирных кислот, уменьшение экспрессии СРТ1, ключевого фермента переноса жирных кислот в митохондрии, что приводит к аккумуляции ТАГ и формированию ЛТ. Подобный механизм в условиях действия бактериального патогена является, по всей вероятности, стратегией выживания клетки, защищающий ее от липотоксичности. Сходство липидного метаболического фенотипа клеток РС12 и нейрональных стволовых клеток позволяет предположить, что нейрогенез может являться важной мишенью действия бактериальных патогенов в структурах ЦНС.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ И БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (№ 075-00776-19-02). Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН за предоставление клеточной линии РС12.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Р.Г.П), сбор данных (С.Д.Н, Е.М.Ф), обработка данных (С.Д.Н, Е.М.Ф, Р.Г.П), написание и редактирование манускрипта (Р.Г.П).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lukiw WJ* (2020) Gastrointestinal (GI) Tract Microbiome-Derived Neurotoxins-Potent Neuro-Inflammatory Signals From the GI Tract via the Systemic Circulation Into the Brain. *Front Cell Infect Microbiol* 10: 22. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00022>
2. *Zhao Y, Jaber V, Lukiw WJ* (2017) Secretory Products of the Human GI Tract Microbiome and Their Potential Impact on Alzheimer's Disease (AD): Detection of Lipopolysaccharide (LPS) in AD Hippocampus. *Front Cell Infect Microbiol* 7: 318. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00318>
3. *Nikolaeva S, Bayunova L, Sokolova T, Vlasova Y, Bachteeva V, Avrova N, Parnova R* (2015) GM1 and GD1a gangliosides modulate toxic and inflammatory effects of *E. coli* lipopolysaccharide by preventing TLR4 translocation into lipid rafts. *Biochim Biophys Acta* 1851(3): 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.12.004>
4. *Wang H, Xu YS, Wang ML, Cheng C, Bian R, Yuan H, Wang Y, Guo T, Zhu LL, Zhou H* (2017) Protective effect of naringin against the LPS-induced apoptosis of PC12 cells: Implications for the treatment of neurodegenerative disorders. *Int J Mol Med* 39(4): 819–830. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2904>

5. Liu X, Xiao Q, Zhao K, Gao Y (2013) Ghrelin inhibits high glucose-induced PC12 cell apoptosis by regulating TLR4/NF-kappaB pathway. *Inflammation* 36(6): 1286–1294.  
<https://doi.org/10.1007/s10753-013-9667-2>
6. Yang Q, Kang ZH, Zhang J, Qu F, Song B (2021) Neuroprotective Effects of Isoquercetin: An In Vitro and In Vivo Study. *Cell J* 23(3): 355–365.  
<https://doi.org/10.22074/cellj.2021.7116>
7. Wu Z, Lu Z, Ou J, Su X, Liu J (2020) Inflammatory response and oxidative stress attenuated by sulfiredoxin1 in neuronlike cells depends on nuclear factor erythroid2related factor 2. *Mol Med Rep* 22(6): 4734–4742.  
<https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11545>
8. Bayunova LV, Parnova RG, Avrova NF (2015) Antiapoptotic effect of gangliosides on PC12 cells exposed to bacterial lipopolysaccharide. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 51(2): 88–94.
9. Wielik K, Wiatrak B, Szczukowski L, Bodetko D, Szandruk-Bender M, Dobosz A, Swiatek P, Gasiorowski K (2020) Effect of Novel Pyrrolo[3,4-d]pyridazinone Derivatives on Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation. *Int J Mol Sci* 21(7).  
<https://doi.org/10.3390/ijms21072575>
10. Wiatrak B, Balon K (2021) Protective Activity of Abeta on Cell Cultures (PC12 and THP-1 after Differentiation) Preincubated with Lipopolysaccharide (LPS). *Mol Neurobiol* 58(4): 1453–1464.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-020-02204-w>
11. Feingold KR, Shigenaga JK, Kazemi MR, McDonald CM, Patzek SM, Cross AS, Moser A, Grunfeld C (2012) Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. *J Leukoc Biol* 92(4): 829–839.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.1111537>
12. Fock E, Bachtееva V, Lavrova E, Parnova R (2018) Mitochondrial-Targeted Antioxidant MitoQ Prevents *E. coli* Lipopolysaccharide-Induced Accumulation of Triacylglycerol and Lipid Droplets Biogenesis in Epithelial Cells. *J Lipids* 2018: 5745790.  
<https://doi.org/10.1155/2018/5745790>
13. Wang J, Si Y, Wu C, Sun L, Ma Y, Ge A, Li B (2012) Lipopolysaccharide promotes lipid accumulation in human adventitial fibroblasts via TLR4-NF-kappaB pathway. *Lipids Health Dis* 11: 139.  
<https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-139>
14. Bailey AP, Koster G, Guillemier C, Hirst EM, MacRae JI, Lechene CP, Postle AD, Gould AP (2015) Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell* 163(2): 340–353.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.020>
15. Lee SJ, Zhang J, Choi AM, Kim HP (2013) Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 327167.  
<https://doi.org/10.1155/2013/327167>
16. Schonfeld P, Reiser G (2021) How the brain fights fatty acids' toxicity. *Neurochem Int* 148: 105050.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105050>
17. Kraemer N, Farese RV, Jr., Walther TC (2013) Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med* 5(7): 973–983.  
<https://doi.org/10.1002/emmm.201100671>
18. Shimabukuro MK, Langhi LG, Cordeiro I, Brito JM, Batista CM, Mattson MP, Mello Coelho V (2016) Lipid-laden cells differentially distributed in the aging brain are functionally active and correspond to distinct phenotypes. *Sci Rep* 6: 23795.  
<https://doi.org/10.1038/srep23795>
19. Yang DS, Stavrides P, Saito M, Kumar A, Rodriguez-Navarro JA, Pawlik M, Huo C, Walkley SU, Saito M, Cuervo AM, Nixon RA (2014) Defective macroautophagic turnover of brain lipids in the TgCRND8 Alzheimer mouse model: prevention by correcting lysosomal proteolytic deficits. *Brain* 137(Pt 12): 3300–3318.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awu278>
20. Girard V, Jollivet F, Knittelfelder O, Celle M, Arsac JN, Chatelain G, Van den Brink DM, Baron T, Shevchenko A, Kuhnlein RP, Davoust N, Mollereau B (2021) Abnormal accumulation of lipid droplets in neurons induces the conversion of alpha-Synuclein to proteolytic resistant forms in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *PLoS Genet* 17(11): e1009921.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009921>
21. Farmer BC, Walsh AE, Klumper JC, Johnson LA (2020) Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci* 14: 742.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00742>
22. Ioannou MS, Jackson J, Sheu SH, Chang CL, Weigel AV, Liu H, Pasolli HA, Xu CS, Pang S, Matthews D, Hess HF, Lippincott-Schwartz J, Liu Z (2019) Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity. *Cell* 177(6): 1522–1535 e14.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.001>

23. Lee LL, Aung HH, Wilson DW, Anderson SE, Rutledge JC, Rutkowski JM (2017) Triglyceride-rich lipoprotein lipolysis products increase blood-brain barrier transfer coefficient and induce astrocyte lipid droplets and cell stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 312(4): C500–C516. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2016>
24. Liu L, MacKenzie KR, Putluri N, Maletic-Savatic M, Bellen HJ (2017) The Glia-Neuron Lactate Shuttle and Elevated ROS Promote Lipid Synthesis in Neurons and Lipid Droplet Accumulation in Glia via APOE/D. *Cell Metab* 26(5): 719–737 e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.024>
25. Marschallinger J, Iram T, Zardeneta M, Lee SE, Lehallier B, Haney MS, Pluvinage JV, Mathur V, Hahn O, Morgens DW, Kim J, Tevini J, Felder TK, Wolinski H, Bertozzi CR, Bassik MC, Aigner L, Wyss-Coray T (2020) Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nat Neurosci* 23(2): 194–208. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0566-1>
26. Khatchadourian A, Bourque SD, Richard VR, Titorenko VI, Maysinger D (2012) Dynamics and regulation of lipid droplet formation in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglia. *Biochim Biophys Acta* 1821(4): 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2012.01.007>
27. Fock E, Lavrova E, Bachtееva V, Nikolaeva S, Parnova R (2019) Suppression of fatty acid beta-oxidation and energy deficiency as a cause of inhibitory effect of *E. coli* lipopolysaccharide on osmotic water transport in the frog urinary bladder. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 218: 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.01.001>
28. Huang YL, Morales-Rosado J, Ray J, Myers TG, Kho T, Lu M, Munford RS (2014) Toll-like receptor agonists promote prolonged triglyceride storage in macrophages. *J Biol Chem* 289(5): 3001–3012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.524587>
29. Feingold KR, Wang Y, Moser A, Shigenaga JK, Grunfeld C (2008) LPS decreases fatty acid oxidation and nuclear hormone receptors in the kidney. *J Lipid Res* 49(10): 2179–2187. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800233-JLR200>
30. Przybytkowski E, Behrendt M, Dubois D, Maysinger D (2009) Nanoparticles can induce changes in the intracellular metabolism of lipids without compromising cellular viability. *FEBS J* 276(21): 6204–6217. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07324.x>
31. Wang F, Wang L, Sui G, Yang C, Guo M, Xiong X, Chen Z, Lei P (2021) IGF-1 Alleviates Mitochondrial Apoptosis through the GSK3beta/NF-kappaB/NLRP3 Signaling Pathway in LPS-Treated PC-12 Cells. *J Mol Neurosci* 71(6): 1320–1328. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01759-6>
32. Xie Y, Zhang H, Zhang Y, Wang C, Duan D, Wang Z (2018) Chinese Angelica Polysaccharide (CAP) Alleviates LPS-Induced Inflammation and Apoptosis by Down-Regulating COX-1 in PC12 Cells. *Cell Physiol Biochem* 49(4): 1380–1388. <https://doi.org/10.1159/000493415>
33. Ma S, Zhang C, Zhang Z, Dai Y, Gu R, Jiang R (2019) Geniposide protects PC12 cells from lipopolysaccharide-evoked inflammatory injury via up-regulation of miR-145-5p. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 47(1): 2875–2881. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1626406>
34. Huang H, Hong Q, Tan HL, Xiao CR, Gao Y (2016) Ferulic acid prevents LPS-induced up-regulation of PDE4B and stimulates the cAMP/CREB signaling pathway in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin* 37(12): 1543–1554. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.88>
35. Nikolaeva S, Sokolova T, Bayunova L, Parnova R (2013) Protective effect of GD1a and GM1 gangliosides against the toxic action of bacterial lipopolysaccharide on neuronal and epithelial cells. *FEBS J* 280(Suppl.1): 433–433.
36. Kapetanovic R, Afroz SF, Ramnath D, Lawrence GM, Okada T, Curson JE, de Bruin J, Fairlie DP, Schroder K, St John JC, Blumenthal A, Sweet MJ (2020) Lipopolysaccharide promotes Drp1-dependent mitochondrial fission and associated inflammatory responses in macrophages. *Immunol Cell Biol* 98(7): 528–539. <https://doi.org/10.1111/imcb.12363>
37. Harland M, Torres S, Liu J, Wang X (2020) Neuronal Mitochondria Modulation of LPS-Induced Neuroinflammation. *J Neurosci* 40(8): 1756–1765. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2324-19.2020>
38. Serviddio G, Giudetti AM, Bellanti F, Priore P, Rollo T, Tamborra R, Siculella L, Vendemiale G, Altomare E, Gnoni GV (2011) Oxidation of hepatic carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) impairs fatty acid beta-oxidation in rats fed a methionine-choline deficient diet. *PLoS One* 6(9): e24084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024084>

39. *Filomeni G, De Zio D, Cecconi F* (2015) Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* 22(3): 377–388.  
<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>
40. *Schonfeld P, Reiser G* (2013) Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 33(10): 1493–1499.  
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128>
41. *Jernberg JN, Bowman CE, Wolfgang MJ, Scafidi S* (2017) Developmental regulation and localization of carnitine palmitoyltransferases (CPTs) in rat brain. *J Neurochem* 142(3): 407–419.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.14072>
42. *Edmond J, Robbins RA, Bergstrom JD, Cole RA, de Vellis J* (1987) Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res* 18(4): 551–561.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.490180407>
43. *Stoll EA, Makin R, Sweet IR, Trevelyan AJ, Miwa S, Horner PJ, Turnbull DM* (2015) Neural Stem Cells in the Adult Subventricular Zone Oxidize Fatty Acids to Produce Energy and Support Neurogenic Activity. *Stem Cells* 33(7): 2306–2319.  
<https://doi.org/10.1002/stem.2042>
44. *Bianchetti G, Di Giacinto F, De Spirito M, Maulucci G* (2020) Machine-learning assisted confocal imaging of intracellular sites of triglycerides and cholesteryl esters formation and storage. *Anal Chim Acta* 1121: 57–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.076>
45. *Wolfgang MJ, Cha SH, Millington DS, Cline G, Shulman GI, Suwa A, Asami M, Kurama T, Shimokawa T, Lane MD* (2008) Brain-specific carnitine palmitoyl-transferase-1c: role in CNS fatty acid metabolism, food intake, and body weight. *J Neurochem* 105(4): 1550–1559.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05255.x>
46. *Ding Y, Zhang H, Liu Z, Li Q, Guo Y, Chen Y, Chang Y, Cui H* (2021) Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) alleviates oxidative stress and apoptosis of hippocampal neuron in response to beta-Amyloid peptide fragment Abeta25–35. *Bioengineered* 12(1): 5440–5449.  
<https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1967032>
47. *Sierra AY, Gratacos E, Carrasco P, Clotet J, Urena J, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Casals N* (2008) CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyl-transferase activity. *J Biol Chem* 283(11): 6878–6885.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M707965200>
48. *Knobloch M, Pilz GA, Ghesquiere B, Kovacs WJ, Wegleiter T, Moore DL, Hruzova M, Zamboni N, Carmeliet P, Jessberger S* (2017) A Fatty Acid Oxidation-Dependent Metabolic Shift Regulates Adult Neural Stem Cell Activity. *Cell Rep* 20(9): 2144–2155.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.029>

**LPS Stimulates Triacylglycerol Accumulation and Lipid Droplets Biogenesis  
in PC12 Cells: Role of Down-Regulation of Carnitine-Palmitoyltransferase 1  
and Suppression of Fatty Acid Oxidation**

**S. D. Nikolaeva<sup>a</sup>, E. M. Fock<sup>a</sup>, and R. G. Parnova<sup>a, \*</sup>**

<sup>a</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,  
Saint-Petersburg, Russia*

*\*e-mail: rimma\_parnova@mail.ru*

It is well known that inflammation and oxidative stress in various cell types induce the formation of lipid droplets (LD), in which fatty acids are deposited as triacylglycerols (TAGs) and/or cholesterol esters. This metabolic shift is critical for protecting cells from toxicity of excess lipids or their oxidative derivatives produced by various types of stressors, including oxidative stress. The effect of bacterial LPS on the formation of LD in CNS structures was studied mainly on microglial cells; however, its effect on the lipid metabolism of neuronal cells, potentially associated with the formation of LD, has not been studied either on cell lines or on primary neuron culture. The aim of this work performed on the neuronal cell line PC12, which is widely used in studies of the mechanisms of neuroinflammation and neurodegeneration, was to study the effect of LPS on the formation of LD, the accumulation of neutral lipids, the metabolism of major lipid classes, and to elucidate the possible mechanism mediating these effects. Incubation of PC12 cells with LPS for 24 h resulted in a significant accumula-

tion of LD and an increase in the content of TAG. Etomoxir, an inhibitor of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), also resulted in an increase in the absolute amount of TAG. To understand the metabolic pathways of TAG accumulation, PC12 cells were preincubated with [<sup>3</sup>H]-oleic acid and then examined for the incorporation of a radioactive label into major lipid classes. LPS caused an increase in the radioactivity of TAG and free oleic acid, accompanied by a significant inhibition of its oxidation and a decrease in radioactivity in phospholipids. Incubation of cells with LPS led to a decrease in CPT1 expression. Our data indicate that in PC12 cells, LPS suppresses expression of CPT1 and fatty acid oxidation which leads to the sequestration of excess fatty acids into TAG and the formation of LD. Such a mechanism under the action of a bacterial pathogen seems to be a survival strategy for the cell protecting it from lipotoxicity.

*Keywords:* PC12 cells, lipopolysaccharide, lipid droplets, triacylglycerol, oxidation of fatty acids, carnitine-palmitoyltransferase 1

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМЕННОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ  
ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС *IN VITRO*© 2022 г. Е. Д. Хилажева<sup>1</sup>, Е. В. Лычковская<sup>1</sup>, В. А. Кутяков<sup>1</sup>,  
А. В. Моргун<sup>1</sup>, В. В. Салмин<sup>1</sup>, \*<sup>1</sup>Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого,  
Красноярск, Россия

\*E-mail: vsalmin@gmail.com

Поступила в редакцию 07.02.2022 г.

После доработки 14.06.2022 г.

Принята к публикации 24.06.2022 г.

Пролиферативная активность клеток эндотелия церебральных микрососудов является объектом регуляции широкого спектра факторов: регуляторных молекул, токсических соединений, межклеточных взаимодействий. Гиперваскуляризация и развитие окислительного и нитрозативного стресса являются важными компонентами патогенеза хронической нейродегенерации. Активные формы кислорода и азота, помимо прямого повреждающего действия на клетки головного мозга, существенным образом влияют на пролиферативную активность и ангиогенный потенциал клеток церебрального эндотелия. В экспериментах *in vitro*, выполненных с использованием первичной культуры клеток церебрального эндотелия крыс, мы оценили пролиферативную активность эндотелиоцитов с помощью технологии “xCelligence”, предназначенной для анализа пролиферации клеток в режиме реального времени, в течение 24–72 ч. Источником активных форм кислорода и азота выступали водные растворы аммиака и тиоцианата, обработанные неравновесной плазмой. Указанные растворы добавлялись в питательную среду клеток в различных концентрациях. Нами впервые установлено, что присутствие активных форм кислорода и азота в составе плазменной кислоты подавляет пролиферацию клеток, вероятно, вследствие доминирования эффектов цитотоксического пероксинитрита и продуктов его взаимодействия с клеточными белками, а присутствие в растворе аммиака стимулирует пролиферацию клеток в дозозависимой манере. Присутствующий в свежеприготовленном растворе тиоцианат анион снижает ингибирующее действие плазменной кислоты на пролиферацию клеток эндотелия, однако при длительной инкубации плазменная кислота с роданидом натрия проявляет существенный цитотоксический потенциал. Суммируя наблюдения о модуляции цитотоксических эффектов плазменной кислоты в отношении клеток церебрального эндотелия в случае обработки воды неравновесной плазмой в присутствии аммиака и тиоцианата, можно предположить участие окислительного и нитрозативного стресса в изученных нами процессах.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, активные формы азота, аммиак, гипотиоцианат, пролиферация, церебральный эндотелий

DOI: 10.31857/S0869813922070032

Окислительный и нитрозативный стрессы играют существенную роль в патогенезе нейродегенерации [1, 2]. Основными процессами, приводящими к развитию окислительного и нитрозативного стресса, выступают дисфункция митохондрий,

активация НАДФН-оксидаз, генерация продуктов каталитической конверсии жирных кислот вследствие повреждения клеток и развития нейровоспаления [3, 4]. Менее изучена роль окислительного и нитрозативного стресса в нарушении целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и повреждении клеток эндотелия церебральных микрососудов, однако известно, что эти события вносят вклад в развитие патологической проницаемости ГЭБ, что может быть сопряжено с развитием феномена гиперваскуляризации (избыточного неоангиогенеза) в ткани головного мозга [2, 5–7]. В связи с этим эндотелиоциты церебральных микрососудов, характеризующиеся специфическими свойствами, отличающими их от клеток эндотелия других тканей (в частности присутствием в церебральном эндотелии большего количества митохондрий), являются интересным объектом для изучения механизмов нейродегенерации и повреждения ГЭБ, ассоциированных с действием широкого спектра соединений, образующихся в клетках при окислительном и нитрозативном стрессе [8]. Примечательно, что окислительный стресс чаще рассматривается в качестве индуктора пролиферативной активности клеток эндотелия [9], а молекулы с проангиогенной активностью, в частности сосудисто-эндотелиальный фактор роста VEGF, индуцируют гиперактивацию НАДФН-оксидазы и генерацию активных форм кислорода (АФК) [9]. В то же время, накопление в клетках нитротирозина как продукта нитрозативного повреждения белков подавляет ангиогенез [10]. Кроме того, церебральный эндотелий является мишенью действия для другого соединения – аммиака, который в условиях *in vivo* образуется в процессе химических превращений свободных аминокислот [11], причем действие аммиака может сопровождаться увеличением продукции монооксида азота, коль скоро аммиак способен индуцировать экспрессию NO-синтазы и развитие нитрозативного стресса, например, в астроцитах [12]. Однако информация о механизмах действия аммиака в условиях окислительного и нитрозативного стресса в литературе отсутствует.

Изучение механизмов окислительного и нитрозативного повреждения клеток, как правило, базируется на применении химических соединений, обладающих способностью генерировать АФК или азота, либо индуцировать их образование в клетках-мишенях [7]. Не менее интересным может быть подход, основанный на использовании *in vitro* соединений, формирующихся при действии неравновесной плазмы на водные растворы, значительная часть которых представлена АФК и азота [13]. К низкомолекулярным активным формам азота (АФА) можно отнести оксид азота (NO), диоксид азота (NO<sub>2</sub>), оксидонитрит (ONOO<sup>-</sup>), нитроксил-анион (NO<sup>-</sup>) и протонированную форму оксидо-нитрита – пероксиазотистую кислоту (HOONO) [14]. Перечисленные АФА могут быть получены в физиологически значимых концентрациях в результате облучения газоразрядной плазмой в атмосферном воздухе воды и водных растворов [15]. Наряду с перечисленными АФА в результате химических преобразований с формирующимися АФК – (HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup>), (OH), (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – происходит постепенное накопление стабильных нитрит- и нитрат-анионов и, как следствие, снижение pH раствора. Поэтому вода, обработанная таким образом, получила название “плазменная кислота” [16, 17]. Состав плазменной кислоты изучен в ряде работ [18–21].

В настоящее время ведутся интенсивные исследования соединений, восстанавливающих функцию эндотелия. В этом контексте перспективными следует считать неорганические тиоцианаты Me(SCN)<sub>x</sub> [22], функционирующие в качестве антиоксидантов и ингибиторов апоптоза [23]. Однако информации о механизмах действия тиоцианат-аниона на клетки церебрального эндотелия в условиях окислительного и нитрозативного стресса фактически нет.

Целью работы явилось изучение влияния плазменной кислоты на пролиферативную активность церебральных эндотелиоцитов *in vitro* в присутствии аммиака и тиоцианат-аниона.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, проводились с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС) и в приказе Минздрава России № 267 от 19.06.2003 г. “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”, рекомендациях биоэтической комиссии по работе с лабораторными животными при локальном этическом комитете и локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета.

Обработка водных растворов объемом 5 мл производилась плазмой искрового разряда в негерметично закрытом стеклянном стаканчике емкостью 50 мл и диаметром 30 мм. Расстояние от искрового канала до поверхности раствора составляло 20 мм. Electroды были выполнены из нержавеющей стали. Межелектродное расстояние составляло 15 мм. Частота следования импульсов составляла 10 Гц. Для обработки растворов использовалась экспозиция  $10^5$  импульсов. Для формирования искрового разряда мы применяли униполярный наносекундный высоковольтный генератор импульсов с напряжением 40 кВ, длительностью импульса 50 нс и энергией 0.2 Дж, описанный нами ранее [24]. Обработка производилась в атмосферном воздухе при комнатной температуре, термостабилизация не производилась. Во всех экспериментах использовался режим обработки 200000 импульсами искрового разряда. Для обработки плазмой искрового разряда мы использовали следующие растворы:

1. Вода для инъекций. До обработки рН 6.9, после обработки 200000 импульсами искрового разряда рН 1.3.
2. Раствор аммиака 0.11 М (вода для инъекций 5 мл + 100 мкл раствора  $\text{NH}_3$  с массовой долей 10%). До обработки рН 11.0, после обработки 200000 импульсами искрового разряда рН 4.6.
3. Раствор роданида натрия (1 мМ раствор  $\text{NaSCN}$ ). До обработки рН 6.8, после обработки 200000 импульсами искрового разряда рН 1.2.

Для приготовления растворов использовали следующие компоненты: вода для инъекций буфус 5 мл, Реневал ПФК (Россия), аммиак 10%-ный раствор для наружного применения и ингаляций, Ивановская фармацевтическая фабрика (Россия), натрия тиоцианат, 99% химически чистый (х. ч.) ГОСТ 10643-75, (Россия).

После обработки искровым разрядом производились определение рН раствора с помощью рН-метра “Анион 4100” (Инфраспа-Аналит, Россия) и запись спектра поглощения в области 200–450 нм с помощью спектрометра СМ2203 (Солар, Беларусь). Полученные при действии искрового разряда растворы использовались для обработки культуральных сред в различных концентрациях. Методом спектрофотометрии обработанного плазмой искрового разряда воды для инъекций определено присутствие, нитрит- и нитрат-анионов по характерным пикам поглощения на 350 и 300 нм соответственно и близко расположенных пиков поглощения на 210 и 205 нм [25]. Наличие указанных анионов обеспечивало приобретение водой низких значений рН. Наличие указанных анионов в растворе также проверялось с использованием системы капиллярного электрофореза Капель-105 (ЛЮМЭКС, Санкт-Петербург). Поскольку при увеличении времени обработки искровым разрядом происходит постепенное накопление указанных анионов [19–21], то контроль качества плазменной кислоты проводился по уровню достигнутого рН.

Источником эндотелиоцитов служили крысы 10-дневного возраста линии Вистар. Выделение и культивирование клеток производили по модифицированному протоколу [26]. Модификация заключалась в замене бычьего сывороточного альбумина (BSA) на фетальную бычью сыворотку (FBS) в равных по белку концентрациях. После декапитации животных у них извлекали головной мозг, удаляли оболочки и крупные поверхностные сосуды. Отделяли кору головного мозга и нарезали на кусочки  $1 \text{ мм}^3$ , после чего центрифугировали в течение 3 мин при 150 g. После удаления супернатанта к осадку добавляли 25%-ный FBS, проводили тритурацию и центрифугировали 10 мин при 600 g. Удаляли супернатант и повторяли процедуру с добавлением 25%-ного FBS, тритурированием и центрифугированием. Осадок собирали и добавляли 1 мл 0.1%-ного раствора коллагеназы II. Ферментативная обработка длилась 35 мин при  $37^\circ\text{C}$  в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора (5%  $\text{CO}_2$ ) с периодическим перемешиванием. После обработки ферментами к суспензии добавляли двойной объем питательной среды, ресуспензировали и центрифугировали осадок при 150 g в течение 5 мин. Культивирование полученных отдельных эндотелиоцитов и фрагментов сосудов осуществлялось в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора (Binder, Германия) при  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  в культуральных флаконах, предварительно покрытых желатином (Gelatin Solution 0.1%. Biological Industries, США) в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ глутамин (ПанЭко, Россия), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Смену среды осуществляли каждые три дня. При достижении 90%-ной конфлюентности среду удаляли, клетки во флаконе промывали дважды раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) и обрабатывали раствором 0.25%-ного раствора трипсина и ЭДТА (ПанЭко, Россия).

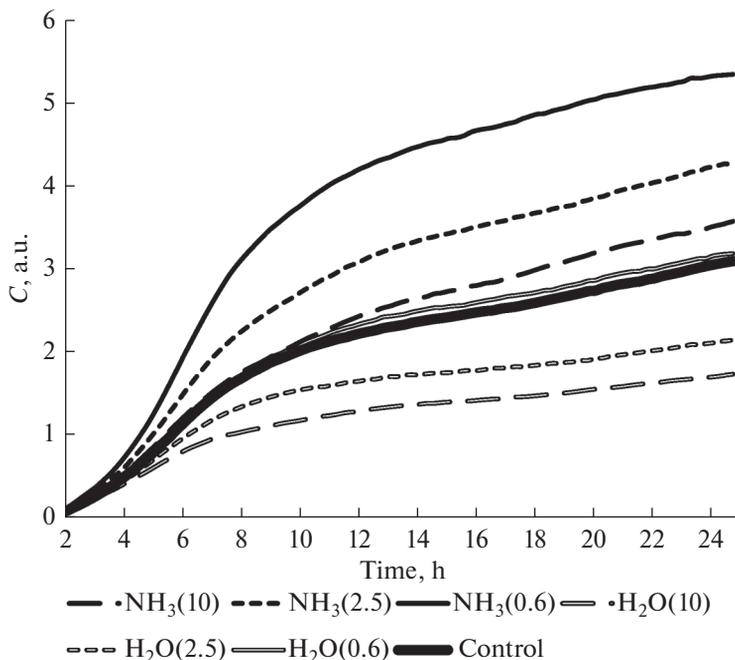
Для непрерывного мониторинга пролиферации *in vitro* эндотелиоциты переносились в 16-луночные планшеты клеточного анализатора “xCelligence” (Roche, Швейцария). В лунки планшета сначала вносилась культуральная среда в объеме 50 мкл и регистрировался нулевой (базальный) уровень. Затем в лунки планшета добавляли по 50 мкл суспензии клеток с количеством 30 000 клеток в каждой лунке. В лунки также добавлялось 100 мкл культуральной среды с внесенным в различных концентрациях обработанной плазмой раствором. В контрольную лунку добавлялась культуральная среда (общий объем в лунке составлял 200 мкл). Для каждого варианта “плазменной кислоты” заседали по три одинаковых лунки с клетками.

В качестве контроля также использовалась культуральная среда без клеток. Инкубация проводилась в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора при 5%  $\text{CO}_2$  и температуре  $37^\circ\text{C}$ . Регистрация осуществлялась с использованием анализатора “xCelligence”, предназначенного для анализа пролиферации клеток в режиме реального времени [27], в течение 24–72 ч. Электроды в лунках планшетов xCelligence регистрируют изменения сопротивления, вызванные присутствием клеток, а специализированное программное обеспечение рассчитывает показатель клеточного индекса (С). Клеточный индекс является импеданс-зависимым и определяется количеством и размерами клеток.

Для статистической обработки использовались методы описательной статистики и метод непараметрической корреляции Спирмена в пакете Statsoft Statistica.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Усредненные кривые клеточного индекса для различных составов и объемов добавок к питательным средам представлены на диаграмме (рис. 1). Как видно из представленных графиков, динамика экспоненциального роста клеток церебрального эндотелия сменяется линейным ростом после 8–10 ч. Клеточный индекс су-



**Рис. 1.** Усредненные кривые зависимости клеточного индекса от времени для церебральных эндотелиоцитов, инкубируемых в средах, содержащих обработанные плазмой искрового разряда растворы. Здесь и далее указаны значения объема плазменной кислоты, внесенного в лунку планшета в мкл.

щественно зависит не только от состава “плазменного раствора”, но и от его конечной концентрации.

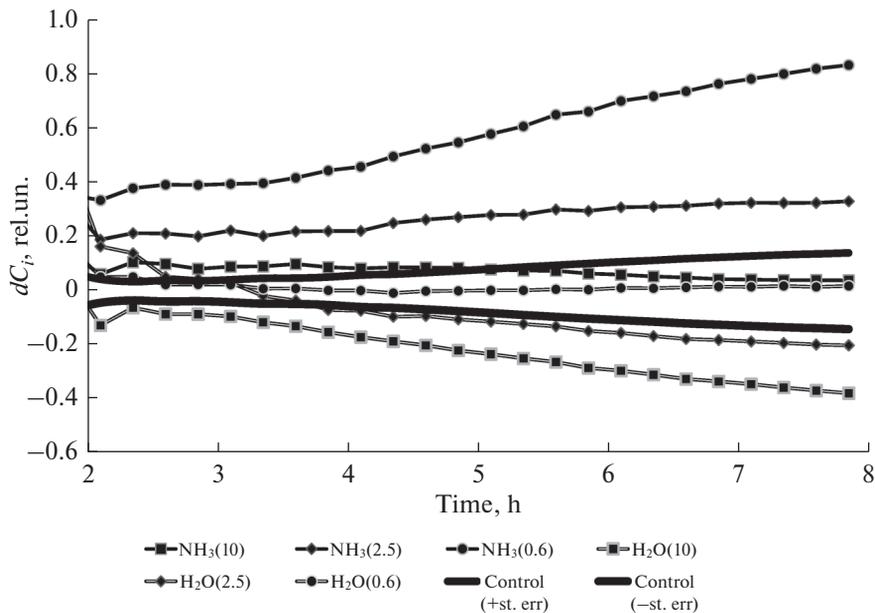
Для сравнительной оценки ингибирования/стимулирования пролиферативной активности мы использовали нормированный разностный клеточный индекс  $dC_i$ , который вычислялся по следующей формуле

$$dC_i = \frac{c_i - c_0}{c_0},$$

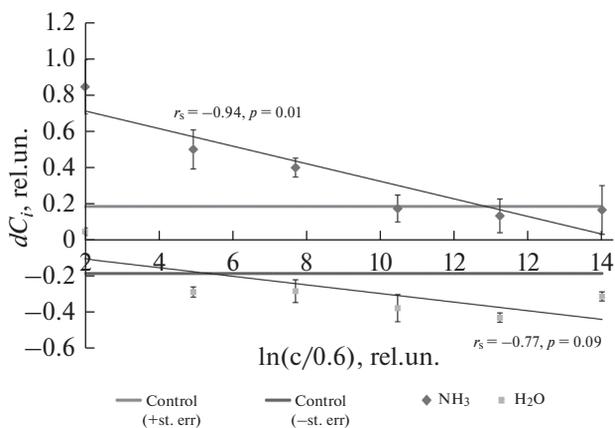
где  $c_i$  – средний клеточный индекс  $i$ -того раствора,  $c_0$  – средний клеточный индекс контрольной группы.

Как видно из представленных диаграмм (рис. 2), на стадии линейного роста клеточного индекса ( $T > 10$  ч) достигается стационарная фаза для нормированного разностного клеточного индекса  $dC_i$ , что позволяет оценивать ингибирование/стимулирование пролиферативной активности путем сравнения их линейных фаз сравнением средних.

Как видно из представленных диаграмм (рис. 3), при использовании растворов на основе аммиака при низких концентрациях имеет место существенная стимуляция пролиферативной активности, в то время как использование дистиллированной воды, обработанной искровым разрядом, однозначно ингибирует пролиферативную активность эндотелиоцитов. С ростом концентрации пролиферативная активность снижается дозозависимым образом. Высокая значимая отрицательная корреляция Спирмена  $r_s = -0.94$ ,  $p = 0.01$  имеет место для плазменной кислоты, содержащей аммиак. Для имеющегося набора данных для чистой плазменной кис-

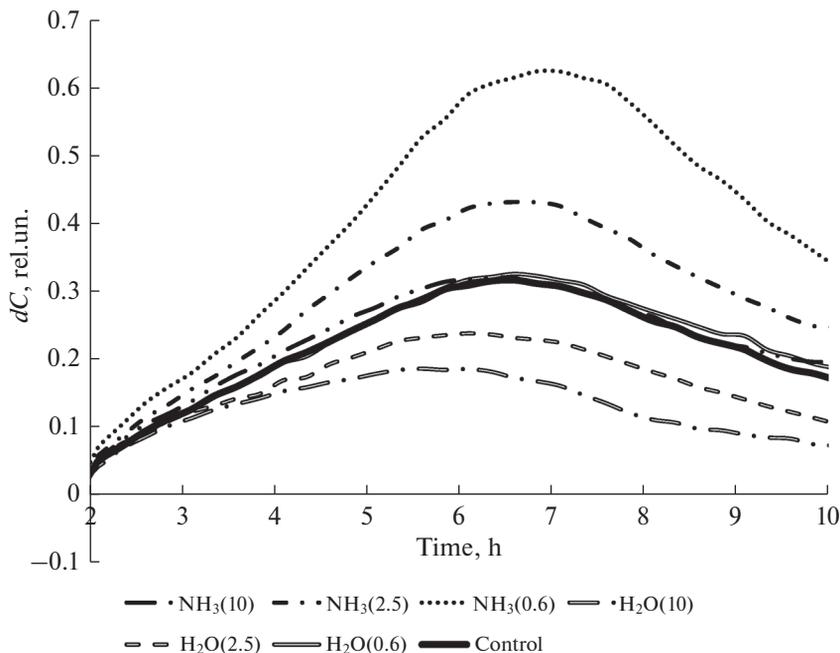


**Рис. 2.** Нормированный разностный клеточный индекс для различных условий инкубации клеток церебрального эндотелия. Значимые изменения достигаются при превышении амплитуды отклонения координата ошибки среднего для контрольного раствора.



**Рис. 3.** Зависимость нормированного разностного клеточного индекса церебральных эндотелиоцитов линейной фазы от логарифма объема плазменной кислоты, внесенного в лунку, нормированного на минимальное значение (0.6 мкл) и состава раствора.

лоты корреляция Спирмена не достигла уровня значимой  $r_s = -0.77, p = 0.09$ . Необходимо отметить, что несмотря на изменение рН “плазменных растворов”, вызванного образованием азотной кислоты за счет искрового разряда, добавление ее в питательную среду в невысоких концентрациях не приводило к значимому изменению рН конечного раствора за счет буферных свойств (согласно технической ин-



**Рис. 4.** Скорость роста клеточного индекса церебральных эндотелиоцитов для различных составов плазменной кислоты.

формации производителя, буферная емкость культуральной среды DMEM составляет не менее 10.5 мл  $\Delta \text{pH} < 0.01$ , и не обнаруживалось в наших экспериментах.

Второй параметр, оцениваемый в наших экспериментах — это время достижения максимальной скорости роста клеточного индекса. Для этого мы проанализировали экспоненциальную фазу. В указанной фазе строились диаграммы скорости роста клеточного индекса  $dC/dT$  — производная от клеточного индекса (рис. 4).

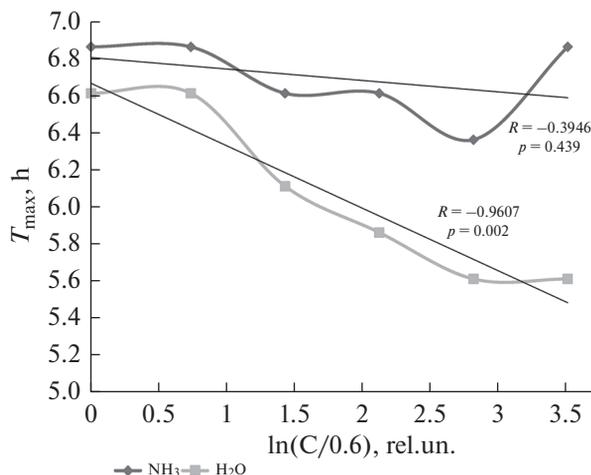
Диаграмма зависимостей времени наступления максимальной скорости роста от логарифма концентрации демонстрирует дозозависимый характер только для плазменной кислоты без аммиака (рис. 5).

Далее мы оценивали влияние плазменной кислоты на основе растворов роданида натрия. Усредненные кривые клеточного индекса по группам клеток, культивируемых в одинаковых по составу питательных средах, представлены на диаграмме (рис. 6).

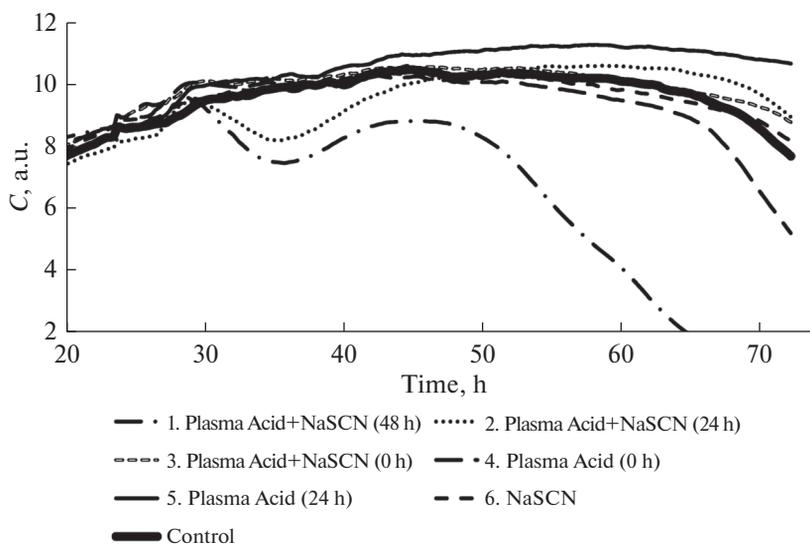
На стадии стационарной фазы ( $T = 24$  ч) мы добавляли в питательную среду плазменную кислоту в одинаковом объеме каждого раствора 10 мкл и оценивали в дальнейшем нормированный разностный клеточный индекс  $dC_i$  (рис. 7). Были использованы растворы плазменной кислоты с различным временем после ее приготовления, давая возможность протеканию в ней окислительно-восстановительных реакций. На рис. 6 и 7 время после обработки указано в часах.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что в составе плазменной кислоты, полученной при обработке растворов неравновесной плазмой, регистрируется присутствие ряда соединений:

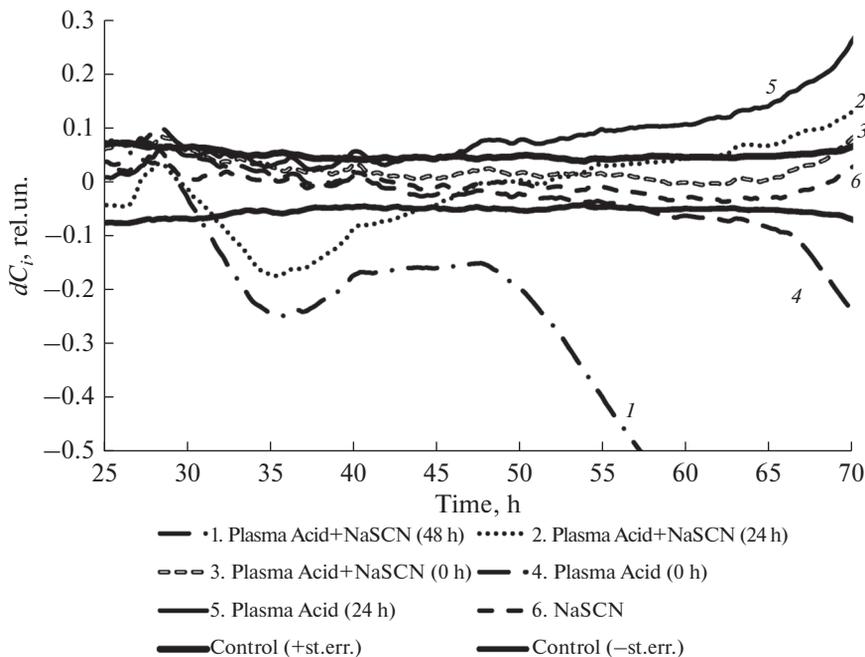


**Рис. 5.** Зависимость времени достижения максимума скорости роста клеточного индекса церебральных эндотелиоцитов от состава и концентрации раствора плазменной кислоты.



**Рис. 6.** Усредненные кривые динамики клеточного индекса для эндотелиоцитов, инкубируемых в средах, содержащих обработанные плазмой искрового разряда растворы.

нитриты, нитраты, пероксинитрит, пероксид водорода и др. [18–21]. Мы обнаружили, что в зависимости от состава активированной плазмы воды могут быть получены эффекты стимуляции и подавления пролиферативной активности клеток церебрального эндотелия *in vitro*, которые носят дозозависимый характер и проявляются как в экспоненциальной (начальной стадии деления), так и линейной фазе. Преобладание азотосодержащих соединений при добавлении аммиака приводит к эффектам стимуляции пролиферации, выражающимся в увеличении амплитуды



**Рис. 7.** Нормированный разностный клеточный индекс для различных условий инкубирования эндотелиоцитов. Значимые изменения достигаются при превышении амплитуды отклонения коридора ошибки среднего для контрольного раствора.

линейной фазы. Преобладание АФК и АФА в плазменной кислоте, полученной на основе дистиллированной воды, демонстрирует ингибирование пролиферации клеток как по амплитуде линейной фазы, так и по более раннему достижению максимальной скорости роста в экспоненциальной фазе (увеличивается отрицательное ускорение – торможение).

Двунаправленный характер действия неравновесной плазмы скользящего разряда на эндотелиоциты был продемонстрирован нами ранее методом иммуногистохимии с регистрацией экспрессии Ki67 как маркера пролиферации [24]: при действии малых концентраций регистрировалась стимуляция, при действии больших – ингибирование пролиферации клеток церебрального эндотелия. Возможным ключевым медиатором этих эффектов является образующийся оксид азота NO, известный как модулятор пролиферации, ареста клеточного цикла и апоптоза [28]. При использовании неравновесной плазмы в парах аммиака для предварительной обработки поверхности культуральных ячеек наблюдали стимуляцию пролиферации эндотелиоцитов [29]. Сигнальная роль аммиака сопряжена с продукцией монооксида азота [12], а введение аммиака позволяет улучшить выживаемость эндотелиоцитов за счет увеличения экспрессии гемоксигеназы HO1 с последующим ростом продукции монооксида углерода CO [30]. Повышенная экспрессия нейрональной синтазы оксида азота (nNOS) и индуцибельной фракции фермента iNOS наблюдалась в стриатуме портокавальных шунтированных крыс с моделью хронической гипераммониемии [11]. Повышалась экспрессия индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) в культивируемых астроцитах под действием аммиака в патофизиологически релевантных концентрациях [31]. Мы предполагаем, что несмотря на раз-

ные механизмы регуляции активности индуцибельной и конститутивной изоформ синтазы оксида азота [32], интересным было бы в дальнейшем протестировать гипотезу об аммиак-индуцируемой гиперпродукции оксида азота клетками церебрального эндотелия и вызванной этими событиями стимуляции пролиферации. Примечательно, что eNOS играет доминирующую роль в индуцированном сосудисто-эндотелиальным фактором роста VEGF ангиогенезе и повышении проницаемости сосудов [33], поэтому механизмы участия этого фермента в регуляции пролиферативного статуса клеток церебрального эндотелия при гипераммониемии заслуживают внимания. Кроме того, возможную роль аммиака в развитии хронической нейродегенерации в последние годы стали все более связывать с его повреждающим действием на ГЭБ [34] и цитотоксическим эффектом, ассоциированным с развитием митохондриальной дисфункции [35]. Клетки церебрального эндотелия, имеющие много митохондрий, являются в этой связи очевидной мишенью для токсического действия аккумулирующегося при нейродегенерации в ткани головного мозга аммиака, который, как показали наши результаты, способен индуцировать пролиферативную активность эндотелиоцитов. Коль скоро характерный для хронической нейродегенерации избыточный церебральный неоангиогенез сопряжен с образованием сосудов с высокой проницаемостью эндотелиального слоя [36, 37], вклад аммиака в прогрессирование нейровоспаления при нейродегенерации является весьма вероятным.

Обращает на себя внимание высокая цитотоксичность плазменной кислоты с роданидом натрия после его длительного отстаивания перед внесением в питательную среду, увеличивающаяся со временем. Вероятной причиной такого поведения может быть образование цианидов в результате окисления тиоцианат-аниона активными формами кислорода и азота плазменной кислоты [38]. Как и в предыдущем цикле экспериментов, внесение свежей плазменной кислоты без добавок приводило к ингибирующему пролиферацию эффекту.

Наиболее вероятным кандидатом из соединений в составе плазменной кислоты на проявление окислительных свойств, необходимых для подавления пролиферативной активности, выступает пероксинитрит  $\text{ONOO}^-$  [15], тогда как формирующиеся через 24 ч стабильные нитриты и нитраты, наоборот, стимулируют пролиферацию. Вместе с тем, нитротирозин, образующийся в результате действия пероксинитрита на клеточные белки, подавляет ангиогенную активность [10], поэтому логично предположить, что наблюдаемое нами антипролиферативное действие плазменной кислоты является следствием аккумуляции в клетках нитротирозина. В то же время следует отметить, что пероксинитрит обладает проангиогенной активностью в отношении клеток церебрального эндотелия и антиангиогенной активностью в отношении эндотелиоцитов периферических тканей [39], поэтому механизмы про- и антиангиогенной активности плазменной кислоты в отношении клеток церебрального эндотелия могут носить более комплексный характер и определяться присутствием в ее составе широкого спектра соединений.

Интересно, что внесение необработанного плазмой раствора роданида не влияло на рост популяции эндотелиоцитов и, более того, свежий раствор плазменной кислоты с роданидом натрия также не влиял на пролиферацию клеток. Можно предположить, что раствор роданида выступает тушителем АФК и АФА [40, 41], а не только проявляет антиоксидантные свойства, как это было показано ранее в присутствии миелопероксидазы, конкурентно ингибируя образование опасного гипохлорита [42, 43]. Такой механизм позволяет предполагать наличие противовоспалительного эффекта тиоцианата, реализуемого в системе с участием клеток эндотелия и лейкоцитов, но это требует дополнительных экспериментальных исследований.

Суммируя наблюдения о модуляции цитотоксических эффектов плазменной кислоты в отношении клеток церебрального эндотелия в случае обработки воды неравновесной плазмой в присутствии аммиака и тиоцианата, можно предположить участие окислительного и нитрозативного стресса в изученных нами процессах.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Минздрава РФ в рамках государственного задания (№ АААА-А19-119060690006-0).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (В.В.С., А.В.М., Е.В.Л.), сбор данных (Е.Д.Х., А.В.М., В.А.К., В.В.С.), обработка данных (В.В.С., А.В.М.), написание и редактирование рукописи (В.В.С.).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием ресурсной базы ЦКП МКТ КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barnham KJ, Masters CL, Bush AI* (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3: 205–214.  
<https://doi.org/10.1038/nrd1330>
2. *Enciu A-M, Gherghiceanu M, Popescu BO* (2013) Triggers and effectors of oxidative stress at blood-brain barrier level: relevance for brain ageing and neurodegeneration. *Oxidat MedCell Longev* 2013: 1–12.  
<https://doi.org/10.1155/2013/297512>
3. *Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S* (2015) The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp Neurobiol* 24: 325.  
<https://dx.doi.org/10.5607%2Fen.2015.24.4.325>
4. *Cobb CA, Cole MP* (2015) Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiol Disease* 84: 4–21.  
<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.nbd.2015.04.020>
5. *Zlokovic BV* (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57: 178–201.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>
6. *Song K, Li Y, Zhang H, An N, Wei Y, Wang L, Tian C, Yuan M, Sun Y, Xing Y* (2020) Oxidative stress-mediated blood-brain barrier (BBB) disruption in neurological diseases. *Oxidat Med Cell Longev* 2020: 1–27.  
<https://doi.org/10.1155/2020/4356386>
7. *Nazari QA, Mizuno K, Kume T, Takada-Takatori Y, Izumi Y, Akaike A* (2012) In vivo brain oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice. *J Pharmacol Sci* 120: 105–111.  
<https://doi.org/10.1254/jphs.12143fp>
8. *Salmina AB, Kharitonova EV, Gorina YV, Teplyashina EA, Malinovskaya NA, Khilazheva ED, Mosyagina AI, Morgun AV, Shuvaev AN, Salmin VV* (2021) Blood-brain barrier and neurovascular unit in vitro models for studying mitochondria-driven molecular mechanisms of neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 22: 4661.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22094661>
9. *Kim Y-W, Byzova TV* (2014) Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood, J Am Soc Hematol* 123: 625–631.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-512749>

10. *Teng R-J, Wu T-J, Bisig CG, Eis A, Pritchard KA, Konduri GG* (2011) Nitrotyrosine impairs angiogenesis and uncouples eNOS activity of pulmonary artery endothelial cells isolated from developing sheep lungs. *Pediatr Res* 69: 112–117.  
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318204dcb8>
11. *Suárez I, Bodega G, Rubio M, Fernández B* (2009) Induction of NOS and nitrotyrosine expression in the rat striatum following experimental hepatic encephalopathy. *Metabol Brain Disease* 24: 395–408.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-009-9154-5>
12. *Wang R* (2014) Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem Sci* 39: 227–232.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.003>
13. *Thi M-HN, Shao P-L, Liao J-D, Lin C-CK, Yip H-K* (2014) Enhancement of Angiogenesis and Epithelialization Processes in Mice with Burn Wounds through ROS/RNS Signals Generated by NonThermal N<sub>2</sub>/Ar Micro-Plasma. *Plasma Processes and Polymers* 11: 1076–1088.  
<https://doi.org/10.1002/ppap.201400072>
14. *Владимиров ЮА, Проскурнина ЕВ* (2015) Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов. *Фундаментальные науки–медицине. Биофиз. мед. технол. М. МАКС Пресс.* [*Vladimirov YuA, Proskurnina YeV* (2015) Svobodnyye radikaly kak uchastniki regulatorynykh i patologicheskikh protsessov. *Fundamental'nyye nauki–meditsine. Biofiz Med Tekhnol. M. MAKS Press.* (In Russ)].
15. *Пискарев ИМ* (2016) Образование долгоживущих активных продуктов под действием излучения плазмы искрового разряда. *Химия высоких энергий* 50: 449–450. [*Piskarev I* (2016) Obrazovaniye dolgozhivushchikh aktivnykh produktov pod deystviyem izlucheniya plazmy iskrovogo razryada. *Khimiya vysokikh energiy* 50: 449–450. (In Russ)].
16. *Иванова ИП, Трофимова СВ, Аристова НА, Архипова ЕВ, Буркина ОЕ, Сысоева ВА, Пискарев ИМ* (2012) Анализ активных продуктов излучения плазмы искрового разряда, определяющих биологические эффекты в клетках. *Соврем технол в мед* 2012: 20–30. [*Ivanova IP, Trofimova SV, Aristova NA, Arkhipova EV, Burkhina OE, Sysoeva VA, Piskarev IM* (2012) Analysis of active products of spark discharge plasma radiation that determine biological effects in cells. *Modern Technol Med* 2012: 20–30. (In Russ)].
17. *Иванова ИП, Трофимова СВ, Пискарев ИМ, Ичеткина АА, Буркина ОЕ, Сысоева ВА* (2013) Влияние излучения плазмы искрового разряда на модификацию белков и липидов. *Фундамент исследований* 3: 572–575. [*Ivanova IP, Trofimova SV, Piskarev IM, Ichetkina AA, Burkhina OE, Sysoeva VA* (2013) Effect of spark discharge plasma radiation on the modification of proteins and lipids. *Basic Res* 3: 572–575. (In Russ)].
18. *Ivanova IP, Trofimova SV, Burkhina OE, Piskarev IM* (2015) Peroxynitrite complex production under pulsed spark gas-discharge plasma radiation in air. *Res J Pharmac Biol Chem Sci* 6: 1205–1219.
19. *Piskarev I, Ivanova I, Trofimova S* (2013) Chemical effects of self-sustained spark discharge: Simulation of processes in a liquid. *High Energy Chem* 47: 62–66.  
<https://doi.org/10.1134/S0018143913020082>
20. *Piskarev I, Ivanova I, Trofimova S* (2013) Comparison of chemical effects of UV radiation from spark discharge in air and a low-pressure mercury lamp. *High Energy Chem* 47: 247–250.  
<https://doi.org/10.1134/S0018143913050093>
21. *Piskarev I, Ivanova I, Trofimova S, Aristova N* (2012) Formation of active species in spark discharge and their possible use. *High Energy Chem* 46: 343–348.  
<https://doi.org/10.1134/S0018143912050050>
22. *Zietzer A, Niepmann ST, Camara B, Lenart MA, Jansen F, Becher MU, Andrié R, Nickenig G, Tiyerili V* (2019) Sodium thiocyanate treatment attenuates atherosclerotic plaque formation and improves endothelial regeneration in mice. *PLoS one* 14: e0214476.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214476>
23. *Bozonet SM, Scott-Thomas AP, Nagy P, Vissers MC* (2010) Hypothiocyanous acid is a potent inhibitor of apoptosis and caspase 3 activation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 49: 1054–1063.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.028>
24. *Muradyan G, Gudkova E, Khilazheva E, Morgun A, Malinovskaya N, Salmina A, Salmin V* (2021) Effect of sliding discharge on proliferation and death of brain microvessel endothelial cells in vitro. *Biomed Chem* 67: 150–157.  
<https://doi.org/10.18097/pbmc20216702150>
25. *Mack J, Bolton JR* (1999) Photochemistry of nitrite and nitrate in aqueous solution: a review. *J Photochem Photobiol A: Chemistry* 128: 1–13.  
[https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(99\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(99)00155-0)
26. *Liu Y, Xue Q, Tang Q, Hou M, Qi H, Chen G, Chen W, Zhang J, Chen Y, Xu X* (2013) A simple method for isolating and culturing the rat brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res*

- 90: 199–205.  
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2013.08.004>
27. Guan N, Deng J, Li T, Xu X, Irelan JT, Wang M-W (2013) Label-free monitoring of T cell activation by the impedance-based xCELLigence system. *Mol Biosystems* 9: 1035–1043.  
<https://doi.org/10.1039/c3mb25421f>
28. Napoli C, Paolisso G, Casamassimi A, Al-Omran M, Barbieri M, Sommesse L, Infante T, Ignarro LJ (2013) Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *J Am College Cardiol* 62: 89–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.03.070>
29. Kleinhans C, Barz J, Wurster S, Willig M, Oehr C, Müller M, Walles H, Hirth T, Kluger PJ (2013) Ammonia plasma treatment of polystyrene surfaces enhances proliferation of primary human mesenchymal stem cells and human endothelial cells. *Biotechnol J* 8: 327–337.  
<https://doi.org/10.1002/biot.201200210>
30. Durante W, Liu Xm, Peyton KJ (2017) Ammonia Promotes Endothelial Cell Survival via the Heme Oxygenase-1-mediated Release of Carbon Monoxide. *The FASEB J* 31: 689.2.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.029>
31. Häussinger D, Görg B, Reinehr R, Schliess F (2005) Protein tyrosine nitration in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metabol Brain Disease* 20: 285–294.  
<https://doi.org/10.1007/s11011-005-7908-2>
32. Forstermann U, Münzel T (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113: 1708–1714.  
<https://doi.org/10.1161/circulationaha.105.602532>
33. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun C-O, Buerk DG, Huang PL, Jain RK (2001) Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2604–2609.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.041359198>
34. Jo D, Kim BC, Cho KA, Song J (2021) The Cerebral Effect of Ammonia in Brain Aging: Blood–Brain Barrier Breakdown, Mitochondrial Dysfunction, and Neuroinflammation. *J Clin Med* 10: 2773.  
<https://doi.org/10.3390/jcm10132773>
35. Adlimoghaddam A, Sabbir MG, Albensi BC (2016) Ammonia as a potential neurotoxic factor in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* 9: 57.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00057>
36. Rigau V, Morin M, Rousset M-C, De Bock F, Lebrun A, Coubes P, Picot M-C, Baldy-Moulinier M, Bocckaert J, Crespel A (2007) Angiogenesis is associated with blood–brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain* 130: 1942–1956.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awm118>
37. Biron KE, Dickstein DL, Gopaul R, Jefferies WA (2011) Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. *PLoS One* 6: e23789.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023789>
38. Jones E, Munkley CG, Phillips ED, Stedman G (1996) Kinetics and equilibria in the nitric acid–nitrous acid–sodium thiocyanate system. *J Chem Soc, Dalton Transact* 1915–1920.  
<https://doi.org/10.1039/DT9960001915>
39. Prakash R, Somanath PR, El-Remessy AB, Kelly-Cobbs A, Stern JE, Dore-Duffy P, Johnson M, Fagan SC, Ergul A (2012) Enhanced cerebral but not peripheral angiogenesis in the Goto-Kakizaki model of type 2 diabetes involves VEGF and peroxynitrite signaling. *Diabetes* 61: 1533–1542.  
<https://doi.org/10.2337/db11-1528>
40. Buxton GV, Stuart CR (1995) Re-evaluation of the thiocyanate dosimeter for pulse radiolysis. *J Chem Soc, Faraday Transact* 91: 279–281.  
<https://doi.org/10.1039/FT9959100279>
41. Aune TM, Thomas EL (1977) Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Eur J Biochem* 80: 209–214.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11873.x>
42. Chandler JD, Day BJ (2012) Thiocyanate: a potentially useful therapeutic agent with host defense and antioxidant properties. *Biochem Pharmacol* 84: 1381–1387.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.029>
43. Xu Y, Szép S, Lu Z (2009) The antioxidant role of thiocyanate in the pathogenesis of cystic fibrosis and other inflammation-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20515–20519.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0911412106>

**Effects of Plasma Acid on Proliferation of Rat Brain Endothelial Cells *in vitro***

**E. D. Khilazheva<sup>a</sup>, E. V. Lychkovskaya<sup>a</sup>, V. A. Kutyaikov<sup>a</sup>,  
A. V. Morgun<sup>a</sup>, and V. V. Salmin<sup>a, \*</sup>**

<sup>a</sup>*Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia*

*\*e-mail: vsalmin@gmail.com*

The proliferative activity of endothelial cells of cerebral microvessels is subject to the regulation of a wide range of factors: regulatory molecules, toxic compounds, intercellular interactions. Hypervascularization and development of oxidative and nitrosative stress are important components in the pathogenesis of chronic neurodegeneration. Reactive oxygen and nitrogen species, in addition to a direct damaging effect on brain cells, significantly affect the proliferative activity and angiogenic potential of cerebral endothelial cells. In the *in vitro* experiments performed on a primary culture of rat brain endothelial cells, we assessed the proliferative activity of endothelial cells using the “xCelligence” protocol designed to analyze cell proliferation in a real time mode for 24–72 hours. Aqueous solutions of ammonia and thiocyanate treated with non-thermal plasma served as the source of reactive oxygen and nitrogen species. These solutions were added to the culture medium at various concentrations. We have established for the first time that due to reactive oxygen and nitrogen species, plasma acid suppresses cell proliferation, probably because of dominating effects of cytotoxic peroxyxynitrite and products of its interactions with cell proteins, whereas presence of ammonia in solution stimulates cell proliferation in a dose-dependent manner. Thiocyanate anion present in the freshly prepared solution reduces the inhibitory effect of plasma acid on the proliferation of endothelial cells, however, prolonged exposure to plasma acid with sodium thiocyanate exhibits a significant cytotoxic potential. In sum, we have found the effects of plasma acid on the proliferative activity of cerebral endothelial cells. These effects are modulated in the presence of ammonia and thiocyanate, thereby suggesting contribution of oxidative and nitrosative stress to the effects observed.

*Keywords:* reactive oxygen species, reactive nitrogen species, ammonia, hypothiocyanate, proliferation, cerebral endothelium