

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 12
декабрь
2023



СОДЕРЖАНИЕ

Обзорные и проблемные статьи

Нейрогенная регуляция мозгового кровотока <i>Д. Д. Ваулина, Д. Ю. Бутко, А. А. Карпов, М. М. Галагудза</i>	1725
Роль активных форм кислорода в регуляции тонуса кровеносных сосудов в перинатальном и раннем постнатальном онтогенезе <i>А. А. Швецова, Д. К. Гайнуллина, О. С. Тарасова</i>	1742
Свободный холин крови как биомаркер физиологического статуса организма <i>Е. И. Савельева, М. А. Ленинский, Н. В. Гончаров</i>	1763
Сродство гемоглобина к кислороду при коронавирусной инфекции: новые грани известной проблемы <i>В. В. Зинчук, Н. В. Глуткина</i>	1780

Экспериментальные статьи

Ненейрональная ГАМК в неокортикальных нейротрансплантатах крыс <i>З. Н. Журавлева, Г. И. Журавлев</i>	1799
Взаимодействие гликированного альбумина с рецептором конечных продуктов гликирования по данным молекулярного моделирования <i>Д. А. Белинская, Н. В. Гончаров</i>	1810
Роль калиевых каналов в регуляции транспортной функции лимфатических узлов крыс при сепсисе <i>Г. И. Лобов</i>	1832
Влияние антигистаминных препаратов на поведенческую активность <i>Danio rerio</i> <i>А. В. Жданов, М. В. Комелькова, М. А. Горбунова, С. Л. Хацко, А. П. Сарапульцев, А. В. Калужев</i>	1847
Экспрессия генов апоптоза и аутофагии в клетках HeLa и НЕК 293 в условиях недостатка питательных веществ <i>А. Д. Трубникова, Е. С. Прокопенко, Т. В. Соколова, О. В. Надей, Н. И. Агалакова</i>	1856
Эндотелий-независимое антисократительное влияние периваскулярной жировой ткани аорты крысы в норме и при метаболических нарушениях, индуцированных диетой кафе <i>М. Н. Панькова</i>	1870
Распределение белков GABARAP и β -III-тубулина в неокортексе крыс в неонатальный период после воздействия перинатальной гипоксии <i>Л. И. Хожай</i>	1883
Особенности угашения памяти о страхе у самцов и самок мышей <i>Disc 1-Q31L</i> <i>Н. Д. Чижова, К. В. Смирнова, Н. И. Дубровина, А. В. Калужев, Т. Г. Амтиславская</i>	1898

Баклофен и производное 4-фенилпирролидона ГИЖ-290 ослабляют компульсивноподобное поведение мышей <i>Н. В. Кудряшов, А. В. Волкова, Я. С. Козин, А. А. Шимширт, П. Л. Наплёкова, А. О. Королёв, Т. А. Воронина</i>	1908
Влияние принудительных беговых нагрузок на содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы и одновалентных катионов в скелетных мышцах мышей с моделью сахарного диабета II типа <i>А. Н. Захарова, К. Г. Милованова, А. А. Орлова, Е. Ю. Дьякова, Ю. Г. Калининкова, О. В. Коллантай, И. Ю. Шувалов, А. В. Чибалин, Л. В. Капилевич</i>	1920
Потенциалы, связанные с событиями, в Go/NoGo тесте как возможные нейромаркеры монотонии <i>М. В. Пронина, М. Г. Старченко, Ю. А. Бойцова, А. А. Богдан, Ю. Г. Хоменко, Г. В. Катаева, Ю. А. Шичкина, Ю. Д. Кропотов</i>	1935
Распад десмина в скелетных мышцах у пациентов в хроническом критическом состоянии <i>С. А. Тыганов, К. А. Зарипова, О. В. Туртикова, Е. Н. Скитева, С. П. Белова, Ю. М. Забродская, С. А. Кондратьев, Е. А. Кондратьева, А. Н. Кондратьев, Б. С. Шенкман</i>	1952

CONTENTS

Reviews

Neurogenic Regulation of Cerebral Blood Flow	
<i>D. D. Vaulina, D. Yu. Butko, A. A. Karpov, and M. M. Galagudza</i>	1725
The Role of Reactive Oxygen Species in the Regulation of Blood Vessel Tone in Perinatal and Early Postnatal Ontogenesis	
<i>A. A. Shvetsova, D. K. Gaynullina, and O. S. Tarasova</i>	1742
Diagnostic Potential of Free Blood Choline as a Biomarker of the Physiological Status of the Organism	
<i>E. I. Savelieva, M. A. Leninskii, and N. V. Goncharov</i>	1763
Hemoglobin Affinity to Oxygen during Coronavirus Infection: New Faces of a Known Problem	
<i>V. V. Zinchuk and N. V. Hlutkina</i>	1780

Experimental Articles

Non-Neuronal GABA in Neocortical Neurografts of the Rats	
<i>Z. N. Zhuravleva and G. I. Zhuravlev</i>	1799
Interaction of Glycated Albumin with Receptor for Glycation End Products According to Molecular Modeling Data	
<i>D. A. Belinskaia and N. V. Goncharov</i>	1810
The Role of Potassium Channels in the Regulation of the Transport Function of Rats Lymph Nodes during Inflammation	
<i>G. I. Lobov</i>	1832
Effects of Antihistamines in Adult Zebrafish in Novel Tank Test	
<i>A. V. Zhdanov, M. V. Komelkova, M. A. Gorbunova, S. L. Khatsko, A. P. Sarapultsev, and A. V. Kalueff</i>	1847
Expression of Apoptosis and Autophagy Genes in HeLa and HEK 293 Cells under Conditions of Nutrient Deprivation	
<i>A. D. Trubnikova, E. S. Prokopenko, T. V. Sokolova, O. V. Nadei, and N. I. Agalakova</i>	1856
Endothelium-Independent Anti-Contractile Effect of Rat Aorta Perivascular Adipose Tissue at Control and Metabolic Disorders Induced by the Cafe Diet	
<i>M. N. Pankova</i>	1870
Distribution of GABARAP and β -III-tubulin Proteins in the Rats Neocortex in the Neonatal Period after Exposure to Perinatal Hypoxia	
<i>L. I. Khozhai</i>	1883
Peculiarities of Fear Memory Disturbance in Male and Female <i>Disc I</i> -Q31L Mice	
<i>N. D. Chizhova, K. V. Smirnova, N. I. Dubrovina, A. V. Kalueff, and T. G. Amstislavskaya</i>	1898
Baclofen and 4-Phenylpyrrolidone Derivative GIZH-290 Attenuates Compulsive-Like Behavior in Mice	
<i>N. V. Kudryashov, A. V. Volkova, Ya. S. Kozin, A. A. Shimshirt, P. L. Naplekova, A. O. Korolev, and T. A. Voronina</i>	1908
Influence of Forced Running Loads on the Content of Na^+/K^+ -ATPase Isoforms and Monovalent Cations in Skeletal Muscles of Mice with a Model of Type II Diabetes Mellitus	
<i>A. N. Zakharova, K. G. Milovanova, A. A. Orlova, E. Yu. Dyakova, Yu. G. Kalinnikova, O. V. Kollantay, I. Yu. Shuvalov, A. V. Chibalin, and L. V. Kapilevich</i>	1920

Event-Related Potentials in Cued Go/NoGo Task are Possible Neuromarkers
of Monotony

*M. V. Pronina, M. G. Starchenko, Yu. A. Boytsova, A. A. Bogdan,
Yu. G. Khomenko, G. V. Kataeva, Yu. A. Shichkina, and Yu. D. Kropotov*

1935

Desmin Degradation in the Skeletal Muscle of Patients with Chronic Critical Illness

*S. A. Tyganov, K. A. Zaripova, O. V. Turtikova, E. N. Skiteva, S. P. Belova,
Yu. M. Zabrodskaya, S. A. Kondratiev, E. A. Kondratieva,
A. N. Kondratiev, and B. S. Shenkman*

1952

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

НЕЙРОГЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА

© 2023 г. Д. Д. Ваулина^{1, *}, Д. Ю. Бутко², А. А. Карпов¹, М. М. Галагудза^{1, 3}

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

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

³Институт аналитического приборостроения Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: uplavice@gmail.com

Поступила в редакцию 27.06.2023 г.

После доработки 06.10.2023 г.

Принята к публикации 06.10.2023 г.

Головной мозг имеет хорошо развитую сосудистую сеть, что позволяет ему потреблять до 15% сердечного выброса при незначительной массе относительно массы всего тела. В норме метаболические потребности головного мозга значительно зависят от интенсивности функционирования различных его отделов, что требует постоянной регуляции уровня местного кровотока. С другой стороны, состояние системной гемодинамики может оказывать значительное влияние на органнй кровоток. Сложные и многоуровневые механизмы регуляции органного мозгового кровотока направлены на минимизацию возможных неблагоприятных последствий влияния нарушений системной гемодинамики. К основным механизмам регуляции мозгового кровотока относят: миогенную регуляцию, влияние местных гуморальных воздействий и вазоактивных веществ (гормонов, метаболитов) системного кровотока, изменение газового состава крови (повышение или снижение в крови напряжения кислорода или углекислого газа). Кроме того, выделяя эндотелий-зависимые механизмы регуляции. Наконец, еще один уровень регуляции тонуса мозговых артерий представлен воздействием нейротрансмиттеров, высвобождающихся из терминалей вазомоторных волокон симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы, а также из окончаний субкортикальных нейронов и кортикальных интернейронов. В настоящем обзоре рассмотрены принципы нейрогенной регуляции мозгового кровотока. Нейрогенная регуляция сосудистого тонуса представляет собой наиболее сложный контур регуляции. Вегетативная иннервация мозговых сосудов имеет существенные особенности, отличающие ее от таковой в большинстве других органов большого круга кровообращения. Кроме собственно вегетативной иннервации, сосуды головного мозга получают сенсорную иннервацию, а мелкие внутримозговые артериолы также иннервируются непосредственно нейронами подкорковых ядер и кортикальными интернейронами. В этой связи более глубокое понимание молекулярных механизмов нейрогенной регуляции мозгового кровотока в перспективе может послужить основой для разработки новых методов лечения тяжелых заболеваний головного мозга, основанных на нейромодуляции.

Ключевые слова: головной мозг, нейрогенная регуляция, симпатическая иннервация, парасимпатическая иннервация, сенсорная иннервация

DOI: 10.31857/S0869813923120130, **EDN:** CHNSWE

ВВЕДЕНИЕ

Головной мозг характеризуется хорошо развитой сосудистой сетью и потребляет около 15% сердечного выброса. При этом масса головного мозга составляет всего 2–3% от массы тела [1]. В норме метаболические потребности головного мозга существенно образом зависят от интенсивности функционирования различных его отделов, что требует постоянной регуляции уровня местного кровотока [2]. С другой стороны, состояние системной гемодинамики может оказывать значительное влияние на органный кровоток. При этом, с учетом огромной важности центральной нервной системы в обеспечении всех физиологических процессов, регуляция органного мозгового кровотока направлена на минимизацию возможных неблагоприятных последствий влияния нарушений системной гемодинамики. Эти эволюционно выработанные особенности мозгового кровотока нашли выражение в сложных физиологических механизмах его регуляции, реализующихся на различных уровнях [3]. При этом диапазон физиологических значений мозгового кровотока не столь широк и варьирует от 25 до 100 мл/100 г мин. [4]. Базовым уровнем регуляции мозгового кровотока является миогенная реакция, которая возникает при изменениях степени растяжения гладкомышечных клеток (ГМК) сосудистой стенки под влиянием давления в просвете сосуда. Миогенный ответ обеспечивает феномен ауторегуляции кровотока в головном мозге. Следующий уровень предполагает наличие внешних местных гуморальных воздействий, в том числе оказываемых метаболитами, на тонус сосудов на уровне нейроваскулярной единицы. Таким образом в основном обеспечиваются локальные изменения мозгового кровотока при функциональной гиперемии. В литературе для обозначения данного феномена часто используется термин “нейрососудистое сопряжение” [5]. Изменения интенсивности мозгового кровотока могут происходить и при повышении концентрации вазоактивных веществ (гормонов, метаболитов) в крови. Вазомоторные реакции сосудов головного мозга опосредованы либо изменением продукции в эндотелии ряда соединений, влияющих на тонус ГМК (эндотелий-зависимые механизмы регуляции), либо действием на ГМК, не требующим участия эндотелия (эндотелий-независимые реакции). Важное значение в регуляции мозгового кровотока имеют повышение или снижение в крови напряжения кислорода или углекислого газа. Указанный механизм хеморегуляции выделяется некоторыми авторами в качестве самостоятельного. Наконец, еще один уровень регуляции тонуса мозговых артерий представлен воздействием нейротрансмиттеров, высвобождающихся из терминалей вазомоторных волокон симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы, а также из окончаний субкортикальных нейронов и кортикальных интернейронов. Между различными контурами регуляции мозгового кровотока существуют множественные взаимодействия, которые заключаются либо во взаимной потенциации их эффектов на сосудистый тонус, либо, напротив, в ослаблении суммарного эффекта при одновременной активации.

В настоящем обзоре рассмотрены принципы нейрогенной регуляции мозгового кровотока. Нейрогенная регуляция сосудистого тонуса представляет собой наиболее сложный контур регуляции. Она осуществляется за счет влияния вазомоторных волокон вегетативной нервной системы, функционально подразделяемых на симпатические и парасимпатические. Вегетативная иннервация мозговых сосудов имеет существенные особенности, отличающие ее от таковой в большинстве других органов большого круга кровообращения [6]. Кроме собственно вегетативной иннервации, сосуды головного мозга получают сенсорную иннервацию, а мелкие внутримозговые артериолы также иннервируются непосредственно нейронами подкорковых ядер и кортикальными интернейронами (центральная иннервация).

ВЕГЕТАТИВНАЯ ИННЕРВАЦИЯ АРТЕРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Симпатическая иннервация

Центральный отдел симпатической нервной системы представлен нейронами ядер гипоталамуса, расположенных вдоль терминальной пластинки (субформиальный орган, срединное преоптическое ядро, сосудистый орган концевой пластинки). Нейроны указанных структур формируют связи с паравентрикулярным ядром, которое интегрирует информацию от этих и других источников и влияет на преганглионарные нейроны латерального промежуточного ядра спинного мозга как прямо, так и через ростральное вентролатеральное мозговое вещество. Клеточные тела постганглионарных нейронов располагаются в верхнем шейном ганглии. Постганглионарные волокна участвуют в формировании нервного сплетения вокруг сонной артерии и формируют синапсы в адвентиции мозговых артерий различного калибра, вплоть до места входа пиальных артерий в глубину паренхимы мозга. Плотность вегетативного нервного сплетения вокруг внутренней сонной артерии выше, чем вокруг артерий вертебробазилярного бассейна [7]. Основным нейромедиатором симпатических нейронов является норадреналин; часть нервных окончаний также выделяет нейропептид Y. ГМК артерий головного мозга экспрессируют различные подтипы адренорецепторов и кальциевых каналов, причем распределение этих подтипов существенным образом зависит от калибра артерий и их локализации в мозге [8]. Так, например, ГМК крупных экстракраниальных артерий, таких как внутренняя сонная или позвоночная артерия, экспрессируют практически исключительно α_1 -адренорецепторы, активация которых приводит к сокращению ГМК и вазоконстрикции. При этом в ГМК пиальных артерий, несмотря на наличие α_1 -адренорецепторов, также присутствуют α_2 - и β_2 -адренорецепторы, стимуляция которых вызывает вазодилатацию. На протяжении сосудистой системы головного мозга отмечается и экспрессия кальциевых каналов. Если в ГМК сосудов других органов экспрессируются только кальциевые каналы L-типа, то в сосудах головного мозга в зависимости от их калибра и локализации могут присутствовать как каналы L-, так и T-типа. Так, крупные артерии содержат смешанную популяцию кальциевых каналов L- и T-типа, что обеспечивает более высокую чувствительность к вазоконстрикторным стимулам [9], тогда как в мелких пиальных артериях содержатся только каналы L-типа.

Необходимо отметить, что, несмотря на высокую плотность адренергической иннервации мозговых артерий, ее физиологическая роль в условиях покоя остается не вполне установленной [10]. В то же время имеются убедительные свидетельства в пользу участия симпатической иннервации артерий головного мозга в обеспечении поддержания миогенного тонуса вблизи от верхнего предела ауторегуляции при значительном повышении артериального давления (АД) [11]. Повышение симпатической активности при этом играет охранительную роль, предотвращая "прорыв" системного АД в микроциркуляторное русло и его баротравму.

Обнаружение симпатических нервных терминалей, заканчивающихся в стенке мозговых артерий, позже дополненное данными об экспрессии в них различных популяций адренорецепторов и кальциевых каналов, привело к неверному представлению о том, что симпатическая стимуляция приводит в артериях головного мозга к тем же функциональным последствиям, что и в других органах, т.е. к констрикции артерий и вен, сопровождающейся уменьшением кровотока [12]. При этом эффекты симпатической активации на мозговой кровоток оказались значительно более сложными и неоднозначными. Как уже указывалось выше, возникающие изменения сосудистого тонуса зависят от распределения и плотности адренорецепторов в каждом конкретном сосудистом сегменте, а также от концентрации норадреналина и наличия других вазоактивных соединений [13]. Другими

словами, повышение тонуса вазомоторных адренергических волокон может приводить как к констрикции, так и к дилатации в зависимости от характера стимула (локальный или системный) и локализации кровеносного сосуда [14]. Например, повышение тонуса адренергических вазомоторных волокон может вызывать вазоконстрикцию в бассейне внутренней сонной артерии, поскольку в ней экспрессируются исключительно α_1 -адренорецепторы, но сопровождаться вазодилатацией в задней мозговой артерии и базилярной артерии, в которых представительство α_1 -адренорецепторов существенно меньше, но при этом экспрессируются β_1 - и β_2 -адренорецепторы.

Основной объем данных о роли симпатической нервной системы в регуляции мозгового кровотока у человека получен при использовании фармакологических агонистов или, напротив, блокаторов специфических подтипов адренорецепторов (табл. 1, 2). Для оценки мозгового кровотока в этом случае наиболее часто используется транскраниальная доплерография, которая позволяет оценивать только линейный кровоток. Большинство исследований с применением антагонистов α_1 -адренорецепторов свидетельствует об участии симпатической иннервации в регуляции мозгового кровотока (табл. 1) [15, 16]. Блокада α_1 -адренорецепторов сопровождается снижением АД, активаций барорефлекса, гипервентиляцией и гипokaпнией. При перепадах АД или гиперкапнии увеличение тонуса симпатических вазомоторных волокон может ограничивать дилатацию артерий мозга и прирост мозгового кровотока. Действительно, в условиях блокады α_1 -адренорецепторов происходит ослабление прироста мозгового кровотока на гиперкапнию и нарушение динамической ауторегуляции кровотока [17, 18]. Клинические физиологические исследования с применением ганглиоблокаторов или неселективных блокаторов α -адренорецепторов показали, что симпатическая иннервация играет важную роль в обеспечении ауторегуляции мозгового кровотока. Так, например, увеличение линейной скорости кровотока в средней мозговой артерии в ответ на повышение АД под влиянием внутривенной инфузии норадреналина было в четыре раза более выраженным на фоне блокады α -адренорецепторов по сравнению с контролем [19]. Данные о физиологической роли симпатической регуляции мозгового кровотока, связанной с активацией β_1 - и β_2 -адренорецепторов, в настоящее время весьма ограничены (табл. 2). Эффект блокады β_1 -адренорецепторов на мозговой кровоток оценивался только в двух исследованиях на здоровых добровольцах (табл. 2). В обоих исследованиях было отмечено снижение линейной скорости кровотока в средней мозговой артерии после блокады β_1 -адренорецепторов и снижение прироста кровотока в ответ на физическую нагрузку [20, 21]. Однако ключевыми факторами, вызывающими указанные изменения, в данном случае могут служить значительное снижение сердечного выброса и среднего АД, опосредованные метопрололом. Следовательно, снижение кровотока в упомянутых работах может являться следствием уменьшения перфузионного давления и других вторичных системных изменений, не связанных с симпатической активацией. Данные экспериментальных исследований показывают, что введение антагонистов β_2 -адренорецепторов также сопровождается уменьшением мозгового кровотока и ограничением способности артерий головного мозга к дилатации [22]. Эти наблюдения подтверждаются единичными работами, выполненными на здоровых добровольцах. Так, Seifert и соавт. [23] показали, что после введения пропранолола у испытуемых уменьшалась степень прироста кровотока по средней мозговой артерии в ответ на физическую нагрузку. Вместе с тем вновь следует подчеркнуть, что в данном исследовании введение пропранолола сопровождалось приростом напряжения CO_2 в выдыхаемом воздухе ($P_{\text{ET}}\text{CO}_2$), а также снижением сердечного выброса и АД, что не исключает наличия не прямых эффектов на мозговой кровоток. В связи с этим

Таблица 1. Исследования, посвященные изучению влияния агонистов и антагонистов α -адренорецепторов на мозговой кровоток у человека

Фармакологический агент	Изменение АД после введения фармакологического агента	Стимул	Дизайн исследования и количество испытуемых	Основные выводы	Источник
Фентоламин (блокада α_1 и α_2 -адренорецепторов)	Без изменений	Воздействие переменного отрицательного давления на нижнюю часть тела	Сравнение исходного кровотока с кровотоком после блокады α -адренорецепторов ($n = 11$)	Отсутствие влияния на кровоток в покое; Нарушение ауторегуляции кровотока после блокады α -адренорецепторов	[16]
Дексметомидин (блокада α_2 -адренорецепторов)	Снижение	Без стимуляции (в покое)	Оценка дозозависимых эффектов (4 дозы, $n = 6$)	Значимое дозозависимое снижение кровотока и увеличение индекса Гослинга	[57]
Клонидин (блокада α_2 -адренорецепторов)	Снижение; нормализация после введения фенилэфрина	Вдыхание CO_2	Сравнение исходного кровотока с кровотоком после введения клонидина и после восстановления АД фенилэфрином ($n = 9$)	Снижение кровотока в покое; Уменьшение выраженности прироста кровотока в ответ на гиперкапнию после блокады α_2 -адренорецепторов (в т.ч. после нормализации АД)	[58]
Клонидин (блокада α_2 -адренорецепторов)	Снижение	Изменение $PaCO_2$ в диапазоне от гипоксии к гиперкапнии	Сравнение кровотока в группе с применением клонидина с кровотоком в группе плацебо ($n = 18$)	Уменьшение выраженности прироста кровотока в ответ на гиперкапнию после блокады α_2 -адренорецепторов; Отсутствие влияния клонидина на степень снижения кровотока при гипоксии	[59]
Празозин (блокада α_1 -адренорецепторов)	Снижение	Гиперкапния, гипоксипния	Сравнение кровотока в группе с применением празозина с кровотоком в группе плацебо ($n = 9$)	Отсутствие влияния празозина на степень увеличения кровотока при гиперкапнии; Уменьшение выраженности снижения кровотока в ответ на гипоксипнию после введения празозина	[60]
Празозин (блокада α_1 -адренорецепторов)	Снижение	Ортостатическая гипотензия (3 мин после вставания)	Сравнение кровотока в группе с применением празозина с кровотоком в группе плацебо ($n = 12$)	Более выраженное снижение кровотока в ответ на гипотензию после введения празозина	[61]
Празозин (блокада α_1 -адренорецепторов)	Снижение	Легкая и умеренная физическая нагрузка	Сравнение изменений кровотока в ответ на нагрузку при использовании празозина и без него ($n = 10$)	Нарушение ауторегуляции кровотока после введения празозина; Ослабление ответа кровотока на нагрузку при применении празозина	[15]

Таблица 1. Окончание

Фармакологический агент	Изменение АД после введения фармакологического агента	Стимул	Дизайн исследования и количество испытуемых	Основные выводы	Источник
Фентоламин (блокада α_1 и α_2 -адренорецепторов)	Без изменений	Воздействие переменного отрицательного давления на нижнюю часть тела (10 мин)	Сравнение исходного кровотока с кровотоком после блокады α -адренорецепторов ($n = 11$)	Нарушение статической и динамической ауторегуляции кровотока после блокады α -адренорецепторов фентоламином	[33]
Празозин (блокада α_1 -адренорецепторов)	Снижение	Гипоксия продолжительностью 60, 220 и 330 с	Сравнение кровотока в группе с применением празозина с кровотоком в группе плацебо ($n = 12$)	Отсутствие влияния празозина на степень выраженности изменений кровотока в ответ на гипоксию	[62]
Празозин (блокада α_1 -адренорецепторов)	Снижение	Спонтанная ауторегуляция	Сравнение кровотока в группе с применением празозина с кровотоком в группе плацебо ($n = 10$)	Нарушение ауторегуляции кровотока после блокады α -адренорецепторов празозином	[18]
Празозин (блокада α_1 -адренорецепторов)	Без изменений	Изометрическая нагрузка (2 мин)	Сравнение кровотока в группе с применением празозина с кровотоком в группе контроля ($n = 9$)	В контроле при нагрузке отмечено увеличение кровотока только по контралатеральной ВСА; При применении празозина нагрузка сопровождалась приростом кровотока и по ипсилатеральной ВСА	[63]
Норадреналин, затем фентоламин (блокада α_1 и α_2 -адренорецепторов)	Повышение после введения норадреналина; снижение после введения фентоламина	Спонтанная ауторегуляция	Сравнение кровотока в группе с применением норадреналина с кровотоком в группе плацебо ($n = 7$)	Отсутствие влияния норадреналина на кровоток; Нарушение ауторегуляции при применении фентоламина	[19]
Дексмететомидин (блокада α_2 -адренорецепторов)	Снижение	Без стимуляции (в покое)	Оценка дозозависимых эффектов (2 дозы, $n = 6$)	Значимое дозозависимое снижение кровотока	[64]
Дексмететомидин (блокада α_2 -адренорецепторов)	Снижение	Окклюзия-реперфузия бедренной артерий (динамическая ауторегуляция)	Сравнение кровотока в группе с применением дексмететомидина с кровотоком в группе плацебо ($n = 14$)	Снижение скорости кровотока после введения дексмететомидина (в покое); Нарушение ауторегуляции кровотока после введения дексмететомидина	[65]

Таблица 2. Исследования, посвященные изучению влияния антагонистов β - и α -/ β -адренорецепторов, а также ганглиоблокаторов на мозговой кровоток у человека

Фармакологический агент	Изменение АД после введения фармакологического агента	Стимул	Дизайн исследования и количество испытуемых	Основные выводы	Источник
Метопролол (блокатор β_1 -адренорецепторов)	Снижение	Умеренная и интенсивная физическая нагрузка	Сравнение исходного кровотока с кровотоком после введения метопролола ($n = 8$)	Снижение кровотока в покое; Отсутствие влияния блокады β_1 -адренорецепторов на ауторегуляцию кровотока	[21]
Пропранолол (блокатор β_2 -адренорецепторов)	Без изменений	Нарастающая физическая нагрузка	Сравнение кровотока в группе с применением пропранолола с кровотоком в группе контроля ($n = 8$)	Отсутствие изменений кровотока в покое; Снижение кровотока вторично по отношению к уменьшению прироста сердечного выброса в ответ на нагрузку	[23]
Празозин и пропранолол (блокатор α_1 - и β_2 -адренорецепторов)	Снижение	Гипобарическая гипоксия	Сравнение степени изменений кровотока, полученных при переходе от нормобарии к гипобарии ($n = 10$)	Снижение кровотока в исходном состоянии; Снижение реактивности на гипоксию	[66]
Триметафан (ганглиоблокатор)	Снижение; восстановление после введения фенилэфрина	Ортостатическая проба	Сравнение исходного кровотока с кровотоком после ортостатизации и с кровотоком в условиях применения ганглиоблокатора ($n = 6$)	Отсутствие влияния триметафана на исходный кровоток и на степень изменения кровотока на ортостаз; Реактивность кровотока на PaCO_2 усиливалась после введения триметафана	[67]
Триметафан (ганглиоблокатор)	Без изменений	Спонтанная ауторегуляция	Сравнение кровотока в группе с применением триметафана с кровотоком в группе плацебо ($n = 12$)	Снижение исходного кровотока; Нарушение ауторегуляции мозгового кровотока	[68]
Триметафан (ганглиоблокатор)	Снижение	Проба Вальсальвы	Сравнение степени изменения кровотока в группе с применением триметафана с кровотоком в группе плацебо ($n = 9$)	Нарушение ауторегуляции при выполнении пробы Вальсальвы в группе с применением ганглиоблокатора	[69]
Метивакалин (односторонняя блокатор симпатического ганглия)	Повышение	Без стимуляции (в покое)	Изменение кровотока на стороне блокады симпатического ганглия ($n = 8$)	Увеличение кровотока по ВСА на стороне блокады после блокады симпатического ганглия	[70]
Метопролол (блокатор β_1 -адренорецепторов) и дилоридин (односторонняя блокатор симпатического ганглия)	Повышение	Физическая нагрузка	Сравнение кровотока в группе контроля с кровотоком после физической нагрузки и с односторонней блокадой симпатического ганглия ($n = 8$)	Блокада симпатического ганглия устраняла эффекты метопролола на кровоток после нагрузки	[20]
Триметафан (ганглиоблокатор)	Снижение	Воздействие отрицательного давления на нижнюю часть тела	Сравнение исходного кровотока с кровотоком после введения триметафана и с кровотоком после триметафана и воздействия отрицательного давления	Нарушение ауторегуляции кровотока при воздействии отрицательного давления	[71]

дизайн подобных исследований требует совершенствования, в частности, путем фиксации значения $P_{ET}CO_2$ и коррекции гипотензии введением вазопрессоров.

Таким образом, поскольку фармакологическое воздействие на адренорецепторы в условиях целостного организма вызывает значимые изменения системных физиологических параметров, которые сами по себе могут оказывать выраженное влияние на мозговой кровоток, интерпретация результатов таких исследований связана с большими трудностями, поскольку при этом крайне сложно отделить прямые эффекты симпатической нервной системы на кровоток от непрямых эффектов, связанных, например, с изменениями АД или $PaCO_2$.

Парасимпатическая иннервация

Важной особенностью нейрогенной регуляции тонуса мозговых артерий является наличие антагонистических воздействий симпатической и парасимпатической иннервации. Наличие тесно взаимодействующих и переплетающихся между собой терминалей симпатической и парасимпатической нервной системы в адвентиции мозговых артерий было описано в начале 1970-х годов [24]. В отличие от головного мозга, в большинстве других органов прямая парасимпатическая иннервация сосудов отсутствует, а нейрогенная вазодилатация достигается за счет уменьшения импульсации по адренергическим вазомоторным волокнам [25].

Анатомическая организация парасимпатической иннервации экстракраниальных и интракраниальных артерий головного мозга включает центральное звено, представленное нейронами, расположенными в верхнем слюноотделительном ядре Варолиева моста [26]. Преганглионарные парасимпатические волокна проходят в составе лицевого нерва и достигают клеточных тел холинергических нейронов, расположенных в крылонебном и ушном ганглиях [27]. Трансмиссия в указанных ганглиях осуществляется с помощью Н-холинорецепторов и устраняется ганглиоблокаторами. Небольшая доля преганглионарных волокон формирует синаптическое переключение в микроганглиях, расположенных в адвентиции внутренней сонной артерии. Постганглионарные волокна распространяются к адвентиции артерий головного мозга и формируют контакты с ГМК артерий до их вступления в пространство Вирхова—Робина. Иммуногистохимическое окрашивание показывает высокую плотность холинергических нервных терминалей в адвентиции мозговых артерий, расположенных на поверхности мозга. Основным нейротрансмиттером в данном случае является ацетилхолин; некоторые постганглионарные нейроны также выделяют вазоактивный интестинальный полипептид и оксид азота [28]. Стимуляция парасимпатических нервов, включая лицевой нерв, сопровождается дилатацией мозговых артерий и увеличением мозгового кровотока [29]. Напротив, удаление крылонебного ганглия в эксперименте устраняет эффекты стимуляции лицевого нерва на мозговой кровоток [30]. Следует отметить, что выраженность парасимпатической иннервации мозговых артерий является видоспецифичной. Показано, что среди млекопитающих наиболее интенсивная иннервация мозговых артерий волокнами парасимпатической нервной системы наблюдается у собак и крыс [31, 32].

Парасимпатическая иннервация мозговых артерий не участвует в реализации эффектов гипоксии и гиперкапнии на мозговой кровоток, но может участвовать в модуляции миогенного ответа и ауторегуляции мозгового кровотока. В частности, показано, что блокада холинергической нервной передачи повышала нижний предел ауторегуляции мозгового кровотока, что свидетельствует о важной роли активной вазодилатации, опосредованной повышением тонуса парасимпатических волокон, в поддержании кровоснабжения головного мозга при низком перфузионном давлении [33]. Опосредованная парасимпатической иннервацией дилатация

артерий головного мозга в настоящее время рассматривается в качестве возможно-го способа улучшения мозгового кровотока у пациентов с ишемическим инсультом [34]. При этом для компенсации возникающего дефицита перфузии могут использоваться как фармакологические подходы, так и имплантируемые устройства, осуществляющие электростимуляцию крылонебного и ушного ганглиев, а также лицевого нерва [35, 36].

СЕНСОРНАЯ ИННЕРВАЦИЯ АРТЕРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Иннервация мозговых и пиальных артерий осуществляется не только вазомоторными волокнами симпатической и парасимпатической нервной системы, но и сенсорными волокнами тригемино-васкулярной системы [27]. Клеточные тела нейронов тригеминальной сенсорной системы располагаются в ганглии тройничного нерва (узле Гассера), а терминалы этих нейронов высвобождают в качестве нейротрансмиттеров субстанцию Р, нейрокинin А, кальцитонин-ген-связанный пептид и пептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза (РАСАР) [37, 38]. Основная часть исследований, посвященных изучению роли этих нейротрансмиттеров в патологии, сосредоточена в области механизмов ноцицепции при мигрени [39]. Немногочисленные экспериментальные исследования позволяют сделать некоторые предварительные выводы относительно участия сенсорных тригеминальных волокон в регуляции мозгового кровотока. Так, известно, что передача сигнала по данным волокнам принимает участие в обеспечении дилатации пиальных артерий по механизму аксон-рефлекса во время эпизодов резкого повышения АД после превышения верхнего предела ауторегуляции мозгового кровотока [40]. Эти данные подчеркивают тот факт, что так называемая пассивная дилатация артерий после срыва ауторегуляции представляет собой более сложное явление, чем механическое растяжение сосудистой стенки под влиянием чрезмерного трансмурального давления. Тем не менее, удаление ганглия тройничного нерва не оказывает значимого эффекта на регионарный мозговой кровоток в состоянии покоя [41], что свидетельствует о минимальной роли тригеминальной системы в регуляции мозгового кровотока в физиологических условиях.

ЦЕНТРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА

Важной отличительной характеристикой иннервации артериального русла головного мозга является то, что волокна периферической нервной системы, т.е. вегетативные и сенсорные нервные окончания, осуществляют полноценную иннервацию лишь до уровня пиальных артерий. Плотность нервных терминалей, образованных этими волокнами в адвентиции артерий, резко уменьшается сразу после погружения пиальных артерий в пространство Вирхова—Робина [27]. При этом пенистрирующие и паренхиматозные артериолы, равно как и микрососуды коры, лишены иннервации со стороны периферической нервной системы [42]. Однако они получают иннервацию непосредственно от таких субкортикальных структур мозга, как голубое пятно, ядро шва, базальное крупноклеточное ядро переднего мозга (ядро Мейнерта), а также от кортикальных интернейронов, которые отдают отростки к периваскулярным пространствам, окружающим артериолы [43, 44]. Такой тип иннервации, в противоположность описанному выше “внешнему” по отношению к ткани головного мозга или “периферическому” по его происхождению из соответствующего отдела нервной системы, получил название “внутреннего” или “центрального”. Терминалы нейронов, осуществляющих центральную иннервацию артериол головного мозга, лишь приблизительно в 7% случаев достигают сосудистой стенки и очень редко формируют контакты с ней [43]. Основная доля

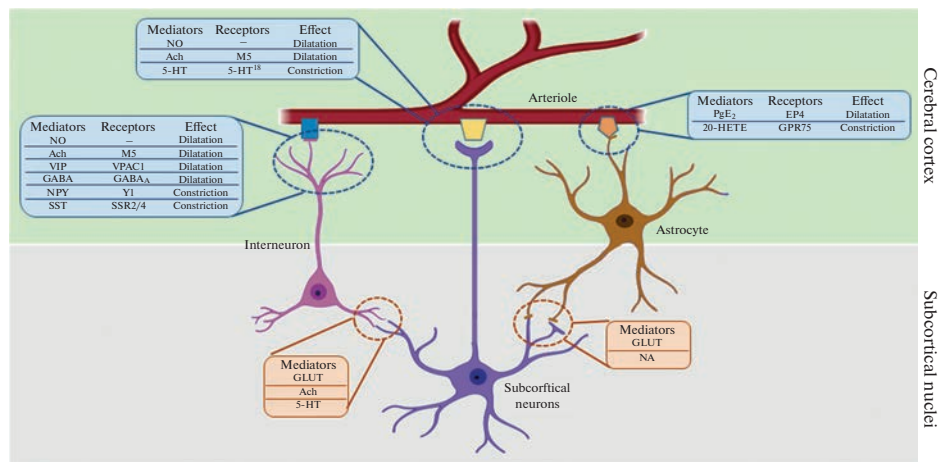


Рис. 1. Нейрогенная регуляция тонуса кортикальных parenхиматозных артериол (по [27], с изменениями). АХ – ацетилхолин, 5-НТ – серотонин, ГЛУТ – глутамат, НА – норадреналин, NO – оксид азота, ВИП – вазоактивный интестинальный полипептид, ГАМК – гамма-аминомасляная кислота, НП Y – нейропептид Y, COM – соматостатин, ПГЕ₂ – простагландин E₂, 20-НЕТЕ – 20-гидроксиэйкозатетраеновая кислота, M5 – мускариновый рецептор 5 типа, VPAC1 – рецептор вазоактивного интестинального полипептида 1, ГАМК_A – ГАМК_A рецептор, Y1 – рецептор нейропептида Y типа 1, SSR2/4 – соматостатиновый рецептор 2/4, 5-НТ_{1B} – серотониновый 1B рецептор, EP4 – рецептор простагландина E₂, GRP75-G_q – связанный рецептор 20-НЕТЕ (на перицитах и эндотелии).

контактов нервных терминалей в этом случае приходится на астроциты, окружающие артериолы и капилляры в нейропиле [45, 46].

Центральная или внутренняя иннервация кортикальных артериол может осуществляться за счет трех типов связей, показанных на рис. 1. Во-первых, клеточные отростки субкортикальных нейронов могут устанавливать прямые контакты с внешней оболочкой сосудистой стенки. Показано, что, например, серотонинергические нейроны ядра шва обеспечивают констрикцию кортикальных артериол за счет активации серотониновых 1B-рецепторов (5-НТ_{1B}) на сосудистых ГМК [47]. Констрикция parenхиматозных артериол может возникать и под влиянием норадренергических нейронов голубого пятна и других центральных адренергических структур, которые активируются, в частности, при повышении внутричерепного давления [48]. Активация α_1 -адренорецепторов на мембране ГМК приводит к повышению цитоплазматического уровня Ca^{2+} и вазоконстрикции. β -адренорецепторы преимущественно экспрессируются в пиальных артериях задних отделов мозга, что определяет внутриорганные регионарные особенности регуляции сосудистого тонуса и кровотока [14]. Воздействие норадреналина на β_1 -адренорецепторы приводит к вазоконстрикции, тогда как стимуляция β_2 -адренорецепторов, напротив, вызывает вазодилатацию. Более интенсивная экспрессия β -адренорецепторов и относительно более низкая плотность α_1 -адренорецепторов в задних отделах головного мозга может рассматриваться как эволюционно выработанный механизм поддержания адекватного кровотока в стволе мозга и коре больших полушарий во время эпизодов симпатической гиперактивности. В роли медиаторов, опосредующих корковую вазодилатацию при стимуляции ядра Мейнерта, могут выступать оксид азота и ацетилхолин, действующий через M5-холинорецепторы [49]. Во-вто-

рых, тонус паренхиматозных артериол может изменяться под влиянием медиаторов, высвобождающихся из корковых интернейронов. Воздействие таких медиаторов из окончаний отростков интернейронов как оксид азота, ацетилхолин, вазоактивный интестинальный полипептид и гамма-аминомасляная кислота вызывает расширение артериол и увеличение регионарного кровотока [50, 51]. С другой стороны, корковые интернейроны могут высвобождать из терминалей и такие нейромедиаторы, как нейропептид Y и соматостатин, которые опосредуют противоположную вазомоторную реакцию – вазоконстрикцию – через соответственно рецептор нейропептида Y типа 1 и соматостатиновый рецептор 2/4 (SSR2/4) [52]. Важно подчеркнуть, что корковые интернейроны могут устанавливать синаптические связи с нейронами подкорковых ядер; таким образом, подкорковые нейроны оказывают как прямое, так и косвенное влияние на сосудистый тонус в коре. В-третьих, на диаметр кортикальных артериол могут влиять биологически активные вещества, высвобождающиеся из отростков астроцитов: простагландин E_2 через EP4-рецепторы вызывает вазодилатацию [53], а метаболит арахидоновой кислоты 20-гидроксизейкозатетраеновая кислота вызывает обратный эффект путем активации GRP75-рецепторов [54]. В последнее время появляются данные о существовании четвертого типа взаимосвязей между клетками, участвующими во внутренней регуляции тонуса мозговых артериол: показано, что корковые интернейроны могут индуцировать высвобождение вазоактивных соединений из астроцитов. Так, Mariotti и соавт. [55] показали, что активация корковых интернейронов, экспрессирующих соматостатин, сопровождается поздним, но длительным повышением концентрации в астроцитах ионов кальция [55]. При этом хорошо известно, что повышение концентрации Ca^{2+} в астроцитах вызывает выраженную локальную вазодилатацию [56]. Данный феномен лежит в основе развития функциональной гиперемии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на достаточно большой объем литературы, посвященной особенностям нейрогенной регуляции мозгового кровотока, дальнейшее развитие данного раздела физиологии регионарного кровообращения в настоящее время сдерживается рядом методических сложностей. Так, большой интерес представляют исследования нейрогенных механизмов регуляции мозгового кровотока в клинических условиях как на здоровых лицах, так и у пациентов с различными заболеваниями центральной нервной системы. До последнего времени в таких исследованиях для оценки кровотока практически исключительно применялась методика транскраниальной доплерографии, которая не позволяет учитывать изменения диаметра сосудов и оценивать регионарные особенности регуляции, в частности, на уровне внечерепных артерий головного мозга. Значительные перспективы могут быть связаны с более широким использованием таких методов оценки общего и регионарного мозгового кровотока, как магнитно-резонансная томография и позитронно-эмиссионная томография. С другой стороны, как уже констатировалось выше, в настоящее время для оценки роли тех или иных рецепторных механизмов регуляции мозгового кровообращения используется системное введение фармакологических агентов, которые, помимо непосредственного влияния на тонус мозговых артерий, вызывают генерализованные изменения функции сердечно-сосудистой системы, оказывающие влияние на мозговой кровоток. Единственным способом преодоления данного методического затруднения является быстрая нормализация параметров системной гемодинамики или предотвращение их возникновения с помощью воздействия на мишени, не связанные с регуляцией мозгового кровотока. Вместе с тем для оценки симпатической активности головного мозга могут применяться методики, не связанные с применением агонистов или блокаторов соответ-

ствующих адренорецепторов, например, оценка скорости выделения норадреналина путем анализа парных проб артериальной крови и крови из яремной вены.

Очевидно, что вегетативная иннервация артериальных сосудов головного мозга имеет целый ряд особенностей в сравнении с иннервацией артерий большинства других органов. При этом, в частности, степень выраженности и направленность вазомоторных эффектов активации симпатических волокон существенно отличаются в различных отделах головного мозга и зависят от типа адренорецепторов, экспрессирующихся в ГМК. При этом существуют сложные взаимосвязи между симпатической и парасимпатической иннервацией сосудов мозга, которые выражаются во взаимной модуляции этих механизмов. Так, например, дилатация артерий вертебробазиллярного бассейна под действием симпатической стимуляции запускается высвобождением оксида азота из парасимпатических терминалей. Дисфункция одного из отделов вегетативной нервной системы неизбежно влечет на собой нарушение функции другого. Более глубокое понимание молекулярных механизмов нейрогенной регуляции мозгового кровотока в перспективе может послужить основой для разработки новых методов лечения тяжелых заболеваний головного мозга, основанных на нейромодуляции.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках госзадания (соглашение № 121031100312-7).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (Б.Д.Ю. и Г.М.М.), сбор данных (К.А.А., Б.Д.Ю.), обработка данных (В.Д.Д., К.А.А.), написание и редактирование манускрипта (Г.М.М., К.А.А., В.Д.Д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21(10): 1133–1145.
<https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001>
2. Бабианиц АЯ, Хананашвили ЯА (2018) Мозговое кровообращение: физиологические аспекты и современные методы исследования. *Журн фундамент мед биол* 3: 46–54. [*Babiyanic AY, Hananashvili YA* (2018) Cerebral circulation: physiological aspects and metody issledovaniya. *J Fundament Med Biol* 3: 46–54. (In Russ)].
3. Claassen JAH, Thijssen DHJ, Panerai RB, Faraci FM (2021) Regulation of cerebral blood flow in humans: physiology and clinical implications of autoregulation. *Physiol Rev* 101(4): 1487–1559.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2020>
4. Thomas SN, Schroeder T, Secher NH, Mitchell JH (1989) Cerebral blood flow during submaximal and maximal dynamic exercise in humans. *J Appl Physiol* (1985) 67(2): 744–748.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1989.67.2.744>
5. Iadecola C (2017) The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 96(1): 17–42.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>

6. Koep JL, Taylor CE, Coombes JS, Bond B, Ainslie PN, Bailey TG (2022) Autonomic control of cerebral blood flow: fundamental comparisons between peripheral and cerebrovascular circulations in humans. *J Physiol* 600(1): 15–39.
<https://doi.org/10.1113/JP281058>
7. Bleys RL, Cowen T (2001) Innervation of cerebral blood vessels: morphology, plasticity, age-related, and Alzheimer's disease-related neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 53(2): 106–118.
<https://doi.org/10.1002/jemt.1075>
8. Brassard P, Tymko MM, Ainslie PN (2017) Sympathetic control of the brain circulation: Appreciating the complexities to better understand the controversy. *Auton Neurosci* 207: 37–47.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.05.003>
9. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L (1990) Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 2(2): 161–192. PMID: 2201348
10. Strandgaard S, Sigurdsson ST (2008) Point:Counterpoint: Sympathetic activity does/does not influence cerebral blood flow. Counterpoint: Sympathetic nerve activity does not influence cerebral blood flow. *J Appl Physiol* (1985) 105(4): 1366–1367; discussion 1367–1368.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.90597.2008a>
11. Cassaglia PA, Griffiths RI, Walker AM (2008) Sympathetic nerve activity in the superior cervical ganglia increases in response to imposed increases in arterial pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(4): R1255–R1261.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00332.2007>
12. Thomas GD (2011) Neural control of the circulation. *Adv Physiol Educ* 35(1): 28–32.
<https://doi.org/10.1152/advan.00114.2010>
13. Gordon GRJ, MacVicar BA, Mulligan SJ (2009) Glia control of blood flow. In: *Encyclopedia of Neuroscience*. LR Squire (ed). Oxford. Acad Press. 737–742.
14. Gezalian MM, Mangiacotti L, Rajput P, Sparrow N, Schlick K, Lahiri S (2021) Cerebrovascular and neurological perspectives on adrenoceptor and calcium channel modulating pharmacotherapies. *J Cereb Blood Flow Metab* 41(4): 693–706.
<https://doi.org/10.1177/0271678X20972869>
15. Purkayastha S, Saxena A, Eubank WL, Hoxha B, Raven PB (2013) α 1-Adrenergic receptor control of the cerebral vasculature in humans at rest and during exercise. *Exp Physiol* 98(2): 451–461.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.066118>
16. Hamner JW, Tan CO, Lee K, Cohen MA, Taylor JA (2010) Sympathetic control of the cerebral vasculature in humans. *Stroke* 41(1): 102–109.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.557132>
17. Hamner JW, Tan CO (2014) Relative contributions of sympathetic, cholinergic, and myogenic mechanisms to cerebral autoregulation. *Stroke*. 45(6): 1771–1777.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005293>
18. Saleem S, Teal PD, Howe CA, Tymko MM, Ainslie PN, Tzeng YC (2018) Is the Cushing mechanism a dynamic blood pressure-stabilizing system? Insights from Granger causality analysis of spontaneous blood pressure and cerebral blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 315(3): R484–R495.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00032.2018>
19. Kimmerly DS, Tutungi E, Wilson TD, Serrador JM, Gelb AW, Hughson RL, Shoemaker JK (2003) Circulating norepinephrine and cerebrovascular control in conscious humans. *Clin Physiol Funct Imaging* 23(6): 314–319.
<https://doi.org/10.1046/j.1475-0961.2003.00507.x>
20. Ide K, Boushel R, Sørensen HM, Fernandes A, Cai Y, Pott F, Secher NH (2000) Middle cerebral artery blood velocity during exercise with beta-1 adrenergic and unilateral stellate ganglion blockade in humans. *Acta Physiol Scand* 170(1): 33–38.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00757.x>
21. Ogoh S, Dalsgaard MK, Secher NH, Raven PB (2007) Dynamic blood pressure control and middle cerebral artery mean blood velocity variability at rest and during exercise in humans. *Acta Physiol (Oxf)* 191(1): 3–14.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01708.x>
22. Hare GM, Worrall JM, Baker AJ, Liu E, Sikich N, Mazer CD (2006) Beta2 adrenergic antagonist inhibits cerebral cortical oxygen delivery after severe haemodilution in rats. *Br J Anaesth* 97(5): 617–623.
<https://doi.org/10.1093/bja/acl238>
23. Seifert T, Rasmussen P, Secher NH, Nielsen HB (2009) Cerebral oxygenation decreases during exercise in humans with beta-adrenergic blockade. *Acta Physiol (Oxf)* 196(3): 295–302.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01946.x>

24. Owman C, Edvinsson L, Nielsen KC (1974) Autonomic neuroreceptor mechanisms in brain vessels. *Blood Vessels* 11(1-2): 2–31.
<https://doi.org/10.1159/000157996>
25. Roloff EV, Tomiak-Baquero AM, Kasparov S, Paton JF (2016) Parasympathetic innervation of vertebralbasilar arteries: is this a potential clinical target? *J Physiol* 594(22): 6463–6485.
<https://doi.org/10.1113/JP272450>
26. Goadsby PJ (2013) Autonomic nervous system control of the cerebral circulation. *Handb Clin Neurol* 117: 193–201.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53491-0.00016-X>
27. Hamel E (2006) Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* (1985) 100(3): 1059–1064.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00954.2005>
28. Edvinsson L, Ekman R (1984) Distribution and dilatory effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human cerebral arteries. *Peptides* 5(2): 329–331.
[https://doi.org/10.1016/0196-9781\(84\)90229-8](https://doi.org/10.1016/0196-9781(84)90229-8)
29. Suzuki N, Hardebo JE (1993) The cerebrovascular parasympathetic innervation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5(1): 33–46.
30. Goadsby PJ, Lambert GA, Lance JW (1984) The peripheral pathway for extracranial vasodilatation in the cat. *J Auton Nerv Syst* 10(2): 145–155.
[https://doi.org/10.1016/0165-1838\(84\)90053-5](https://doi.org/10.1016/0165-1838(84)90053-5)
31. D'Alecy LG, Rose CJ (1977) Parasympathetic cholinergic control of cerebral blood flow in dogs. *Circ Res* 41(3): 324–331.
<https://doi.org/10.1161/01.res.41.3.324>
32. Scremin OU, Rovere AA, Raynald AC, Giardini A (1973) Cholinergic control of blood flow in the cerebral cortex of the rat. *Stroke* 4(2): 233–239.
33. Hamner JW, Tan CO, Tzeng YC, Taylor JA (2012) Cholinergic control of the cerebral vasculature in humans. *J Physiol* 590(24): 6343–6352.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.245100>
34. Cheyuo C, Jacob A, Wu R, Zhou M, Coppa GF, Wang P (2011) The parasympathetic nervous system in the quest for stroke therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 31(5): 1187–1195.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.24>
35. Khurana D, Kaul S, Bornstein NM (2009) ImpACT-1 Study Group. Implant for augmentation of cerebral blood flow trial 1: a pilot study evaluating the safety and effectiveness of the Ischaemic Stroke System for treatment of acute ischaemic stroke. *Int J Stroke* 4(6): 480–485.
<https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2009.00385.x>
36. Baker TS, Robeny J, Cruz D, Bruhat A, Iloreta AM, Costa A, Oxley TJ (2021) Stimulating the Facial Nerve to Treat Ischemic Stroke: A Systematic Review. *Front Neurol* 12: 753182.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.753182>
37. Ashina H, Schytz HW, Ashina M (2019) CGRP in Human Models of Migraine. *Handb Exp Pharmacol* 255: 109–120.
https://doi.org/10.1007/164_2018_128
38. Ashina M, Hansen JM, Do TP, Melo-Carrillo A, Burstein R, Moskowitz MA (2019) Migraine and the trigeminovascular system – 40 years and counting. *The Lancet Neurol* 18: 795–804.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30185-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30185-1)
39. Waeber C, Moskowitz MA (2005) Migraine as an inflammatory disorder. *Neurology* 64(10 Suppl 2): S9–S15.
https://doi.org/10.1212/wnl.64.10_suppl_2.s9
40. Sakas DE, Moskowitz MA, Wei EP, Kontos HA, Kano M, Ogilvy CS (1989) Trigemino-vascular fibers increase blood flow in cortical gray matter by axon reflex-like mechanisms during acute severe hypertension or seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(4): 1401–1405.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.4.1401>
41. Moskowitz MA, Wei EP, Saito K, Kontos HA (1988) Trigeminal-ectomy modifies pial arteriolar responses to hypertension or norepinephrine. *Am J Physiol* 255(1 Pt 2): H1–H6.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1988.255.1.H1>
42. Faraci FM, Mayhan WG, Werber AH, Heistad DD (1987) Cerebral circulation: effects of sympathetic nerves and protective mechanisms during hypertension. *Circ Res* 61(5 Pt 2): 102–106.
43. Cohen Z, Molinatti G, Hamel E (1997) Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 17(8): 894–904.
<https://doi.org/10.1097/00004647-199708000-00008>
44. Estrada C, Mengual E, González C (1993) Local NADPH-diaphorase neurons innervate pial arteries and lie close or project to intracerebral blood vessels: a possible role for nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 13(6): 978–984.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.122>

45. Allaman I, Pellerin L, Magistretti PJ (2000) Protein targeting to glycogen mRNA expression is stimulated by noradrenaline in mouse cortical astrocytes. *Glia* 30(4): 382–391.
46. Köster K, Klein J (1999) Adrenergic modulation of astroglial phospholipase D activity and cell proliferation. *Brain Res* 830(1): 138–145.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01416-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01416-x)
47. Elhousseiny A, Hamel E (2001) Sumatriptan elicits both constriction and dilation in human and bovine brain intracortical arterioles. *Br J Pharmacol* 132(1): 55–62.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703763>
48. Guild SJ, Saxena UA, McBryde FD, Malpas SC, Ramchandra R (2018) Intracranial pressure influences the level of sympathetic tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 315(5): R1049–R1053.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00183.2018>
49. Elhousseiny A, Hamel E (2000) Muscarinic—but not nicotinic—acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles: a possible role for the M5 receptor subtype. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(2): 298–305.
<https://doi.org/10.1097/00004647-200002000-00011>
50. Cauli B, Tong XK, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, Hamel E (2004) Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci* 24(41): 8940–8949.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3065-04.2004>
51. Yang G, Huard JM, Beitz AJ, Ross ME, Iadecola C (2000) Stellate neurons mediate functional hyperemia in the cerebellar molecular layer. *J Neurosci* 20(18): 6968–6973.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-18-06968.2000>
52. Perrenoud Q, Rossier J, Férézou I, Geoffroy H, Gallopin T, Vitalis T, Rancillac A (2012) Activation of cortical 5-HT(3) receptor-expressing interneurons induces NO mediated vasodilatations and NPY mediated vasoconstrictions. *Front Neural Circuits* 6: 50.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00050>
53. Davis RJ, Murdoch CE, Ali M, Purbrick S, Ravid R, Baxter GS, Tilford N, Sheldrick RL, Clark KL, Coleman RA (2004) EP4 prostanoid receptor-mediated vasodilatation of human middle cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 141(4): 580–585.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705645>
54. Yu M, Cambj-Sapunar L, Kehl F, Maier KG, Takeuchi K, Miyata N, Ishimoto T, Reddy LM, Falck JR, Gebremedhin D, Harder DR, Roman RJ (2004) Effects of a 20-HETE antagonist and agonists on cerebral vascular tone. *Eur J Pharmacol* 486(3): 297–306.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.01.009>
55. Mariotti L, Losi G, Lia A, Melone M, Chiavegato A, Gómez-Gonzalo M, Sessolo M, Bovetti S, Forli A, Zonta M, Reque LM, Marcon I, Pugliese A, Viollet C, Bettler B, Fellin T, Conti F, Carmignoto G (2018) Interneuron-specific signaling evokes distinctive somatostatin-mediated responses in adult cortical astrocytes. *Nat Commun* 9(1): 82.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02642-6>
56. Lind BL, Brazhe AR, Jessen SB, Tan FC, Lauritzen MJ (2013) Rapid stimulus-evoked astrocyte Ca²⁺ elevations and hemodynamic responses in mouse somatosensory cortex in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(48): E4678–E4687.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1310065110>
57. Zornow MH, Maze M, Dyck JB, Shafer SL (1993) Dexmedetomidine decreases cerebral blood flow velocity in humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 13(2): 350–353.
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.45>
58. Lee HW, Caldwell JE, Dodson B, Talke P, Howley J (1997) The effect of clonidine on cerebral blood flow velocity, carbon dioxide cerebral vasoreactivity, and response to increased arterial pressure in human volunteers. *Anesthesiology* 87(3): 553–558.
<https://doi.org/10.1097/00005542-199709000-00015>
59. Maekawa T, Cho S, Fukusaki M, Shibata O, Sumikawa K (1999) Effects of clonidine on human middle cerebral artery flow velocity and cerebrovascular CO₂ response during sevoflurane anesthesia. *J Neurosurg Anesthesiol* 11(3): 173–177.
<https://doi.org/10.1097/00008506-199907000-00003>
60. Peebles KC, Ball OG, MacRae BA, Horsman HM, Tzeng YC (2012) Sympathetic regulation of the human cerebrovascular response to carbon dioxide. *J Appl Physiol* (1985) 113(5): 700–706.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00614.2012>
61. Lewis NC, Ainslie PN, Atkinson G, Jones H, Grant EJ, Lucas SJ (2013) Initial orthostatic hypotension and cerebral blood flow regulation: effect of α₁-adrenoreceptor activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304(2): R147–R154.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00427.2012>

62. Lewis NC, Smith KJ, Bain AR, Wildfong KW, Numan T, Ainslie PN (2015) Impact of transient hypotension on regional cerebral blood flow in humans. *Clin Sci (Lond)* 129(2): 169–178. <https://doi.org/10.1042/CS20140751>
63. Fernandes IA, Mattos JD, Campos MO, Machado AC, Rocha MP, Rocha NG, Vianna LC, Nobrega AC (2016) Selective α 1-adrenergic blockade disturbs the regional distribution of cerebral blood flow during static handgrip exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310(11): H1541–H1548. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00125.2016>
64. Drummond JC, Dao AV, Roth DM, Cheng CR, Atwater BI, Minokadeh A, Pasco LC, Patel PM (2008) Effect of dexmedetomidine on cerebral blood flow velocity, cerebral metabolic rate, and carbon dioxide response in normal humans. *Anesthesiology* 108(2): 225–232. <https://doi.org/10.1097/01.anes.0000299576.00302.4c>
65. Ogawa Y, Iwasaki K, Aoki K, Kojima W, Kato J, Ogawa S (2008) Dexmedetomidine weakens dynamic cerebral autoregulation as assessed by transfer function analysis and the thigh cuff method. *Anesthesiology* 109(4): 642–650. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181862a33>
66. Ainslie PN, Lucas SJ, Fan JL, Thomas KN, Cotter JD, Tzeng YC, Burgess KR (2012) Influence of sympathoexcitation at high altitude on cerebrovascular function and ventilatory control in humans. *J Appl Physiol* (1985) 113(7): 1058–1067. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00463.2012>
67. Jordan J, Shannon JR, Diedrich A, Black B, Costa F, Robertson D, Biaggioni I (2000) Interaction of carbon dioxide and sympathetic nervous system activity in the regulation of cerebral perfusion in humans. *Hypertension* 36(3): 383–388. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.36.3.383>
68. Zhang R, Zuckerman JH, Iwasaki K, Wilson TE, Crandall CG, Levine BD (2002) Autonomic neural control of dynamic cerebral autoregulation in humans. *Circulation* 106(14): 1814–1820. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000031798.07790.fe>
69. Zhang R, Crandall CG, Levine BD (2004) Cerebral hemodynamics during the Valsalva maneuver: insights from ganglionic blockade. *Stroke* 35(4): 843–847. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000120309.84666.AE>
70. Umeyama T, Kugimiya T, Ogawa T, Kandori Y, Ishizuka A, Hanaoka K (1995) Changes in cerebral blood flow estimated after stellate ganglion block by single photon emission computed tomography. *J Auton Nerv Syst* 50(3): 339–346. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(94\)00105-s](https://doi.org/10.1016/0165-1838(94)00105-s)
71. Mitsis GD, Zhang R, Levine BD, Tzanalaridou E, Katritsis DG, Marmarelis VZ (2009) Autonomic neural control of cerebral hemodynamics. *IEEE Eng Med Biol Mag* 28(6): 54–62. <https://doi.org/10.1109/MEMB.2009.934908>

Neurogenic Regulation of Cerebral Blood Flow

D. D. Vaulina^{a, *}, D. Yu. Butko^b, A. A. Karpov^a, and M. M. Galagudza^{a, c}

^aAlmazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

^bSt. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

^cInstitute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

*e-mail: uplavice@gmail.com

The brain has a well-developed vascular network, which allows it to consume up to 15% of the cardiac output with a low mass relative to the whole-body weight. Normally, the metabolic demands of the brain depend considerably on the intensity of functioning of its different departments, which requires constant regulation of the local blood flow level. On the other hand, the state of systemic hemodynamics can have a significant impact on the organ blood flow. Complex and multilevel mechanisms of the regulation of organ cerebral blood flow are aimed at minimizing the possible adverse effects of systemic hemodynamics impairment. The importance of precise and prompt regulation of cerebral blood flow is reinforced by the absence of energy reserves or substrates for its autonomous production in the nervous tissue. The main mechanisms of cerebral blood flow regulation include: myogenic regulation, influence of local humoral influences and vasoactive substances (hormones, metabolites) of systemic blood flow, changes in blood gas composition (increase or decrease in blood oxygen or carbon dioxide tension). In ad-

dition, endothelium-dependent mechanisms of regulation are distinguished. Finally, one more level of cerebral arterial tone regulation is represented by the effect of neurotransmitters released from vasomotor fibers terminals of sympathetic and parasympathetic sections of autonomic nervous system, as well as from subcortical neurons and cortical interneurons terminals. In the present review, the principles of neurogenic regulation of cerebral blood flow are considered. The neurogenic regulation of vascular tone is the most complex regulatory circuit. The autonomic innervation of cerebral vessels has significant features that distinguish it from that in most other organs of the great circulatory circle. In addition to the autonomic innervation proper, the vessels of the brain receive sensory innervation, and the small intracerebral arterioles are also innervated directly by subcortical neurons and cortical interneurons. In this connection, a deeper understanding of the molecular mechanisms of the neurogenic regulation of cerebral blood flow may serve as a basis for the development of new methods of treatment of severe brain diseases based on neuromodulation in the long term.

Keywords: brain, neurogenic regulation, sympathetic innervation, parasympathetic innervation, sensory innervation

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА
КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ В ПЕРИНАТАЛЬНОМ
И РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2023 г. А. А. Швецова^{1, *}, Д. К. Гайнуллина¹, О. С. Тарасова^{1, 2}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com

Поступила в редакцию 01.09.2023 г.

После доработки 12.10.2023 г.

Принята к публикации 16.10.2023 г.

Активные формы кислорода (АФК) на протяжении многих лет рассматривались в качестве негативных регуляторов сердечно-сосудистой системы. Действительно, избыточная продукция АФК характерна для многих сердечно-сосудистых заболеваний. Особенно ярко повреждающее влияние АФК может проявляться в организме новорожденного, поскольку в этот период констрикторное влияние АФК в сосудах легких остается высоким, как и в сосудах плода, а системы антиоксидантной защиты еще не успели сформироваться. Поэтому в первые часы и дни самостоятельной жизни легочные сосуды склонны к сокращению, прежде всего из-за низкой биодоступности эндотелиального NO, что повышает риск развития легочной гипертензии новорожденных. Вместе с тем в перинатальный период онтогенеза АФК играют важную роль в адаптивных реакциях системы кровообращения: они обеспечивают перекрытие артериального протока и разобщение малого и большого кругов кровообращения сразу после рождения, а также способствуют сокращению периферических сосудов при гипоксии, которая часто сопутствует процессу родов, что обеспечивает приоритетное кровоснабжение головного мозга в этих условиях. Вазомоторное влияние АФК сохраняется и в раннем постнатальном онтогенезе, но имеет иной характер. Действие АФК служит одним из механизмов увеличения эндотелий-зависимого расслабления легочных сосудов в первые недели жизни. Кроме того, в период раннего постнатального онтогенеза АФК могут играть важную роль в регуляции тонуса системных сосудов. В данном обзоре изложены современные представления о вазомоторной роли АФК в сосудах легочного и системного кругов кровообращения и рассмотрены механизмы влияния АФК на функционирование эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов в перинатальном и раннем постнатальном периодах развития организма.

Ключевые слова: активные формы кислорода, ранний постнатальный онтогенез, перинатальный период, тонус сосудов, эндотелий, гладкая мышца

DOI: 10.31857/S0869813923120105, **EDN:** CHPLLM

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) – малые химически активные молекулы, образующиеся в клетке в процессе окислительно-восстановительных реакций. К АФК относят кислородные радикалы и пероксиды: обладающий большой реак-

ционной способностью и коротким временем жизни супероксидный анион-радикал O_2^- и являющийся более стабильной нерадикальной молекулой пероксид водорода (H_2O_2) [1, 2]. Также к АФК относятся азотсодержащие соединения, такие как оксид азота (NO), диоксид азота ($NO_2\cdot$) и пероксинитрит ($ONOO^-$). Однако эту группу веществ, как правило, рассматривают отдельно от “классических” АФК, выделяя в категорию активных форм азота [3]. АФК обладают широким спектром функций в различных органах и тканях, в том числе в сердечно-сосудистой системе.

На протяжении многих лет АФК рассматривали в качестве негативных регуляторов, оказывающих повреждающее влияние на функционирование клеток. Действительно, развитие многих заболеваний сердечно-сосудистой системы, таких как легочная и артериальная гипертензия, сахарный диабет и др., связано с повышенной продукцией АФК [4, 5]. В то же время исследования последних лет демонстрируют важную роль АФК в нормальном функционировании системы кровообращения. Так, показано, что АФК участвуют в регуляции тонуса кровеносных сосудов [2, 6]. Кроме того, в относительно низких концентрациях АФК влияют на процессы пролиферации, роста и дифференцировки эндотелиальных и гладкомышечных клеток (ГМК) [1, 7], которые активно протекают в развивающемся организме. Они регулируют процессы васкулогенеза и ангиогенеза [8, 9], а также дифференцировку ГМК в сократительный фенотип [10, 11], то есть задействованы в регуляции формирования и созревания сосудистой системы.

Следует отметить, что регуляция тонуса сосудов как легочного, так и системного кругов кровообращения в перинатальном и раннем постнатальном периодах во многом отличается от таковой у взрослых. Это продемонстрировано для целого ряда механизмов, реализующихся на уровне эндотелия и ГМК. Так, снижение сопротивления легочных сосудов после рождения, а также поддержание системного артериального давления на сравнительно низком уровне у новорожденных во многом связано со значимым сосудорасширяющим влиянием продуцируемого эндотелием оксида азота и калиевых каналов ГМК [12–16]. Наряду с этим, функциональный вклад некоторых проконстрикторных механизмов, например, сигнального пути Rho-киназы, в легочных и системных сосудах также выше в период раннего постнатального онтогенеза [17–19]. Вероятно, одновременное повышение активности как вазодилататорных, так и вазоконстрикторных механизмов создает широкий диапазон изменений сосудистого тонуса, что важно для адаптации новорожденного организма к новым условиям окружающей среды. Примечательно, что АФК прямо или опосредованно способны влиять на перечисленные выше сигнальные пути [2, 3]. В связи с этим участие АФК в регуляции тонуса сосудов у новорожденных может обладать рядом особенностей по сравнению со взрослым организмом. Таким образом, целью данного обзора является обобщение современных представлений о вазомоторной роли АФК в сосудистой системе в периоды перинатального и раннего постнатального онтогенеза.

1. ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ И МИШЕНИ АФК В СОСУДАХ

Основными источниками АФК в клетках кровеносных сосудов являются электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) митохондрий, ферменты NADPH-оксидазы (NOX) и супероксиддисмутазы (SOD) [2, 3].

ЭТЦ митохондрий состоит из четырех комплексов, которые последовательно транспортируют электроны с молекул NADH на кислород с образованием воды. По мере переноса электронов происходит транспорт протонов из матрикса в межмембранное пространство, что создает движущую силу, способствующую образованию АТФ в комплексе V (АТФ-синтазе). Большинство электронов, поступающих в ЭТЦ, в конечном итоге восстанавливают кислород до воды в комплексе IV,

однако небольшая часть электронов “уходит” из цепи в комплексе I или III с образованием O_2^- [20]. Образовавшийся O_2^- , с одной стороны, способен выходить в цитоплазму через специальные анионные каналы [21]. С другой стороны, супероксиддисмутазы (SOD1 и SOD2), расположенные в митохондриях, катализируют дисмутацию O_2^- в H_2O_2 , который может свободно диффундировать из органеллы, опосредуя клеточную передачу сигналов или, в высоких концентрациях, способствуя развитию окислительного стресса.

Еще один функционально важный источник АФК в сосудах — NADPH-оксидазный ферментативный комплекс. В целом описано 7 изоформ NADPH-оксидаз (NOX1-5 и DUOX1-2). В кровеносных сосудах могут экспрессироваться шесть изоформ NOX: NOX1, 2, 4 и 5 (у грызунов NOX5 не обнаружена) и DUOX1-2 [3, 22], при этом NOX1, 2 и 5 продуцируют O_2^- , а NOX4 и DUOX1-2 — в основном H_2O_2 . NOX, локализованные в плазматической мембране, продуцируют АФК преимущественно во внеклеточное пространство из-за ориентации каталитических субъединиц. Затем O_2^- попадает во внутриклеточное пространство через анионные каналы (например, хлорные каналы ClC-3 [23]), либо дисмутируется до H_2O_2 , который может проникать в клетку путем пассивной диффузии через плазматическую мембрану или через аквапориновые каналы [24, 25]. Помимо плазматической мембраны, NOX могут быть локализованы во внутриклеточных органеллах: митохондриях, саркоплазматическом ретикулуме и ядре [2]. Примечательно, что локализация разных изоформ NOX в пределах плазматической мембраны может различаться. Так, в эндотелиальных клетках NOX1, 2 и 5, но не NOX4, локализованы в caveолах, что может определять сигнальные функции АФК, продуцируемых той или иной изоформой NOX [26].

SOD дисмутируют O_2^- до менее агрессивной и более стабильной молекулы H_2O_2 . Таким образом, с одной стороны, SOD можно отнести к антиоксидантным системам (устранение O_2^-), а с другой стороны — к АФК-продуцирующим ферментам (синтез H_2O_2). Изоформы SOD отличаются металлами, входящими в состав активного центра фермента, а также локализацией в клетке. Так, в активном центре SOD1 и SOD3 находятся ионы цинка и меди, а SOD2 — марганца. При этом SOD1 является цитоплазматической изоформой, а также локализована в межмембранном пространстве митохондрий, SOD2 расположена в матриксе митохондрий, а SOD3 является внеклеточной изоформой фермента [27]. Все три изоформы SOD экспрессируются в клетках кровеносных сосудов [6, 27].

Эффекты влияния АФК на тонус сосудов во взрослом организме подробно рассмотрены в ранее опубликованных обзорах [1–3, 27]. В целом показано, что АФК способны вызывать как сокращение, так и расслабление артерий. Например, O_2^- способствовал сокращению легочных артерий [28, 29] и аорты крыс [30], артерий скелетной мускулатуры [6, 29], средней мозговой артерии [29], а также афферентных почечных артериол мышей [31]. В то же время бедренная артерия и артерии брыжейки крыс расслаблялись в ответ на увеличение продукции O_2^- [28, 29]. H_2O_2 обладал сократительным влиянием в аорте мышей [32], но вызывал расслабление афферентных почечных артериол мышей [31] и бедренной артерии крыс [33]. В коронарных артериях и артериях брыжейки крыс H_2O_2 способен как усиливать сокращение, так и ослаблять его [34, 35].

Разнонаправленное влияние АФК на тонус сосудов связывают с их влиянием на ряд мишеней в эндотелии и ГМК. Просократительное влияние АФК связано прежде всего со снижением продукции NO эндотелием. Дело в том, что O_2^- взаимодействует с NO с образованием пероксинитрита ($ONOO^-$), который способствует разобщению эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), окисляя тетрагидробиоптерин (BH_4), необхо-

димый для ее димеризации [3]. Разобшенная eNOS производит меньше вазодилатирующего NO, но больше O_2^- , в результате эндотелий-зависимое расслабление становится менее выраженным.

На уровне ГМК АФК могут способствовать увеличению внутриклеточной концентрации кальция, а следовательно, сокращению несколькими способами: активируя потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа [36, 37] или неселективные катионные каналы TRPC (transient receptor potential channels, type C) [32], увеличивая чувствительность IP3-рецепторов саркоплазматического ретикулума к IP3 (инозитол-3-фосфат) [38], а также снижая активность потенциал-управляемых калиевых каналов (K_v) [39]. Кроме того, АФК могут способствовать сокращению путем влияния на сигнальные пути, активность которых напрямую не зависит от внутриклеточной концентрации кальция: пути MAP-киназ [40, 41], Rho-киназы [28, 42], Src-киназы [43]. Вазорелаксирующее действие АФК может быть связано с их прямым активирующим влиянием на протеинкиназу G [31, 44, 45], которая, в свою очередь, фосфорилирует множество мишеней в ГМК [46], в том числе различные калиевые каналы, приводя в итоге к расслаблению.

Судя по всему, итоговый “знак” вазомоторного влияния АФК зависит от множества факторов и может различаться в зависимости от принадлежности сосуда к малому или большому кругу кровообращения, диаметра/порядка ветвления сосуда, концентрации АФК и компартмента их секреции в клетке. Как будет рассмотрено далее, “знак” влияния АФК на тонус сосудов также может зависеть от стадии развития организма.

2. РОЛЬ АФК В РАЗОБЩЕНИИ ЛЕГОЧНОГО И СИСТЕМНОГО КРУГОВ КРОВООБРАЩЕНИЯ ПОСЛЕ РОЖДЕНИЯ

В малом круге кровообращения сразу после рождения происходят драматические изменения в связи с переходом от плацентарного газообмена к легочному. Относительно гипоксическая среда плода способствует сужению легочных сосудов и соответственно повышению их сопротивления кровотоку [47–50]. Чтобы не перфузировать кровью неработающие легкие, а также снизить нагрузку на правый желудочек, в сердечно-сосудистой системе плода имеются два шунта, соединяющие круги кровообращения: овальное отверстие в межпредсердной перегородке и артериальный (боталлов) проток (АП), который обеспечивает сброс крови из легочной артерии в аорту. После рождения эти шунты закрываются и происходит разобщение двух кругов кровообращения. Доказано, что закрытие АП связано с повышением напряжения кислорода в крови и реализуется с участием АФК (рис. 1).

В ранних исследованиях на препаратах АП кролика и человека было показано, что нормоксия (повышение содержания кислорода до 21%) вызывает сокращение, увеличение содержания H_2O_2 , а также подавление тока K_v в ГМК [39, 51]. Ингибиторы ЭТЦ митохондрий устраняли рост продукции H_2O_2 в ответ на нормоксию [39]. По мнению авторов, нормоксия вызывает повышение продукции АФК митохондриями (преимущественно H_2O_2), что приводит к снижению активности каналов K_v , деполяризации мембраны ГМК и сокращению АП.

Кроме того, участником сократительной реакции АП млекопитающих на нормоксию может быть Rho-киназа — фермент, играющий ключевую роль в механизме кальциевой сенситизации ГМК [52]. В экспериментах на АП человека и кролика было показано, что сократительный ответ на нормоксию, связанный с генерацией H_2O_2 митохондриями, уменьшается в три раза после удаления Ca^{2+} из наружного раствора или блокады ключевых механизмов его повышения в цитоплазме ГМК, а остаточный “ Ca^{2+} -независимый” компонент реакции устраняется ингибитором

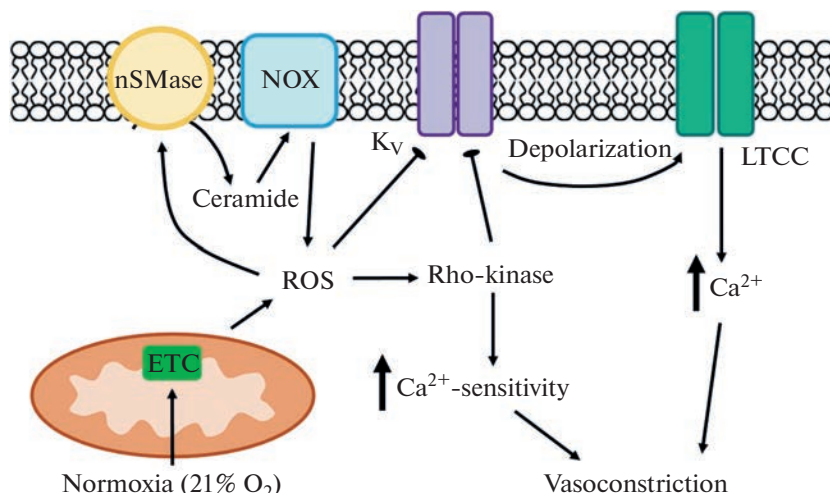


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая роль АФК (ROS) в сокращении артериального протока при нормоксии. ETC — электрон-транспортная цепь митохондрий, LTCC — потенциал-активируемые кальциевые каналы L-типа, nSMase — нейтральная сфингомиелиназа, NOX — NADPH-оксидаза, Rho-kinase — Rho-киназа. Острые стрелки — активирующее влияние, тупые стрелки — ингибирующее влияние.

Rho-киназы [53]. Увеличение содержания O_2 в среде приводило к повышению активности Rho-киназы (судя по приросту фосфорилирования ее основной мишени в ГМК — регуляторной субъединицы фосфатазы легких цепей миозина по ингибиторному сайту Thr696), а через час экспозиции — также к повышению содержания белка Rho-киназы в ткани АП.

Позже сходные эффекты АФК были выявлены в экспериментах на легочной части АП куриных эмбрионов [49]. В данном случае легочную часть АП выделяют отдельно, поскольку АП куриных эмбрионов обладает уникальным свойством: в отличие от млекопитающих он формируется в результате слияния двух сосудов с разным эмбриологическим происхождением, морфологией и реактивностью на кислород и АФК [54, 55]. Легочная часть АП состоит преимущественно из клеток-производных нервного гребня, имеет структуру артерии мышечного типа, сокращается на повышение парциального давления O_2 , как и АП млекопитающих [54, 55]. Аортальная же часть имеет мезодермальное происхождение и морфологию артерии эластического типа, она расслабляется в ответ на O_2 . Эта особенность позволяет оценивать специфичность реакций на различные стимулы “истинного” АП (легочной части) и “контрольного” сосуда (аортальной части).

В исследовании Cogolludo и соавт. было показано, что нормоксия вызывает сокращение легочной части АП зрелых куриных эмбрионов и расслабление аортальной части [49]. Примечательно, что сокращение легочной части значительно ослаблялось на фоне ингибиторов различных комплексов ЭТЦ митохондрий, потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа, а также Rho-киназы. Кроме того, нормоксия сопровождалась повышением содержания как O_2^- , так и H_2O_2 в ткани только легочной части АП. Отсутствие изменений содержания H_2O_2 в ответ на нормоксию в аортальной части, вероятно, связано с высокой экспрессией в ней каталазы — фермента, катализирующего разложение H_2O_2 до H_2O . Таким образом, механизмы сокращения легочной части АП зрелых куриных эмбрионов при нормоксии схожи с таковыми в АП млекопитающих: увеличение синтеза H_2O_2 , подав-

ление активности каналов K_v , деполяризация и активация потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа, а также повышение чувствительности сократительного аппарата ГМК к Ca^{2+} с участием Rho-киназы.

Еще один участник реакции сокращения АП на нормоксию — церамид, сфинголипид плазматической мембраны, образующийся в результате гидролиза сфингомиелина ферментами сфингомиелиназами. Примечательно, что АФК способны активировать сфингомиелиназы, и, следовательно, способствовать увеличению количества церамида в клетке [56]. Ингибирование активности нейтральной сфингомиелиназы или подавление синтеза этого фермента путем РНК-интерференции вызывало существенное снижение реакций сокращения АП эмбрионов курицы и человека на нормоксию [57]. В соответствии с этим нормоксия приводила к увеличению продукции церамида в ГМК легочной части АП эмбрионов курицы, а добавление экзогенных церамида и сфингомиелиназы воспроизводило эффекты нормоксии на АП, т.е. вызывало снижение амплитуды тока K_v и сокращение [57]. Мишенью церамида в ГМК АП являются NOX [58], их ингибирование значительно ослабляет сократительные реакции АП на нормоксию. Таким образом, авторы предполагают следующую цепочку событий: нормоксия вызывает рост продукции АФК митохондриями, АФК активируют сфингомиелиназу и образуется церамид, активирующий NOX, а продуцируемые NOX АФК подавляют активность каналов K_v , что в конечном счете ведет к сокращению (рис. 1).

Примечательно, что АП незрелых плодов овец (E103–105, продолжительность гестации около 145 дней) и кроликов (E26, продолжительность гестации около 30 дней) развивают менее выраженные сократительные реакции на повышение кислорода по сравнению со зрелыми плодами [59–61]. Легочная же часть АП незрелых куриных эмбрионов (E15) совсем не сокращалась при 21% O_2 [49]. В соответствии с этим нормоксия не вызывала изменений содержания АФК в стенке АП незрелых эмбрионов, что может быть связано с более высокой экспрессией SOD1 [49]. Наконец, было показано, что для ГМК легочной части АП незрелых эмбрионов характерно наличие нечувствительных к кислороду K_v токов низкой амплитуды, тогда как K_v токи в ГМК зрелых эмбрионов были чувствительными к кислороду и имели высокую амплитуду. Таким образом, механизм, обеспечивающий сокращение АП в ответ на нормоксию с участием АФК, формируется к концу внутриутробного развития.

Рассмотренные в этом разделе данные позволяют заключить, что АФК играют важную роль в физиологической реакции сокращения АП после рождения, механизмы их вазомоторного влияния обобщены на рис. 1.

3. РОЛЬ АФК В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА АРТЕРИЙ МАЛОГО КРУГА КРОВООБРАЩЕНИЯ В ПЕРИОД РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Важно отметить, что поддержание высокого сопротивления сосудов малого круга кровообращения плода в период внутриутробного развития во многом связано с действием АФК [57]. При этом механизмы вазоконстрикторного влияния АФК в легочных артериях плода сходны с таковыми в АП, но стимулом к их активации является не нормоксия, а гипоксия [57]. После рождения вслед за сокращением АП необходимо обеспечить снижение сопротивления малого круга кровообращения. Известно, что сосудорасширяющее влияние эндотелиального NO играет важную роль в снижении тонуса легочных артерий в ранний постнатальный период [15, 16]. В то же время переход от плацентарного дыхания к легочному сопровождается резким повышением оксигенации органов и тканей, что может приводить к избыточной продукции АФК [62–64] и, как следствие, к снижению биодоступности NO [65].

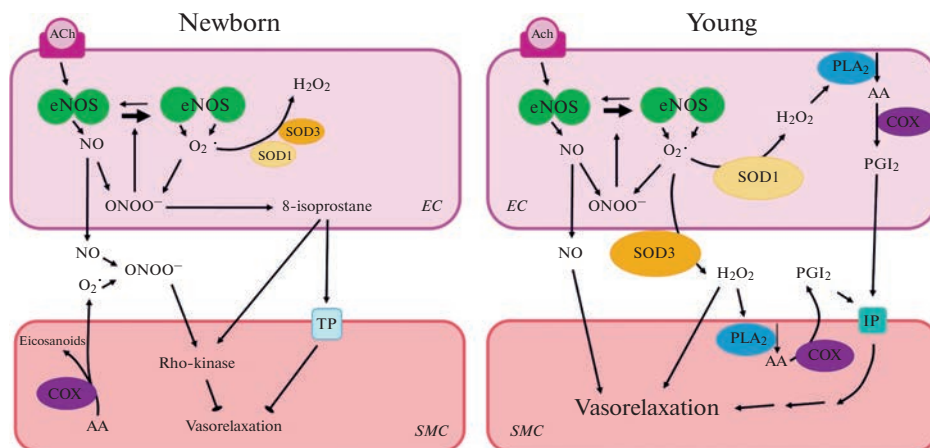


Рис. 2. Схемы, иллюстрирующие роль АФК в регуляции тонуса легочных артерий у новорожденных (слева) и более зрелых (в возрасте до 4 нед., справа) животных. Слабая выраженность реакции эндотелий-зависимого расслабления в легочных артериях новорожденных животных связана с низкой биодоступностью NO вследствие высокой продукции АФК в эндотелии и ГМК и низкой экспрессией антиоксидантных систем (прежде всего, SOD). На более позднем этапе развития реакции эндотелий-зависимого расслабления становятся выраженными благодаря повышению экспрессии SOD, которые способствуют сохранности NO, а также синтезируют H₂O₂, вызывающий расслабление ГМК. AA (arachidonic acid) – арахидоновая кислота, Ach (acetylcholine) – ацетилхолин, 8-isoprostane – 8-изопропан, COX (cyclooxygenase) – циклооксигеназа, PGI₂ (prostaglandin I₂) – простаглицин, PLA₂ (phospholipase A₂) – фосфолипаза A₂, EC (endothelial cell) – эндотелиальная клетка, SMC (smooth muscle cell) – ГМК, TP (thromboxane A₂ receptor) – рецептор тромбоксана A₂, IP (prostaglandin I₂ (prostacyclin) receptor) – рецептор простаглицина. Острые стрелки – активирующее влияние, тупые стрелки – ингибирующее влияние.

Такие события, по крайней мере отчасти, могут лежать в основе развития легочной гипертензии новорожденных – патологического состояния, являющегося одной из ведущих причин смертности среди младенцев [66]. С другой стороны, целый ряд работ демонстрирует важную роль АФК в нормальной регуляции сосудистого тонуса в раннем постнатальном периоде, в том числе, их участие в реализации эндотелий-зависимого расслабления легочных артерий. Как будет рассмотрено далее, этот механизм созревает постепенно, в связи с чем вазомоторная роль АФК оказывается неодинаковой сразу после рождения и на более поздних стадиях развития (рис. 2).

3.1. ВЛИЯНИЕ АФК ОГРАНИЧИВАЕТ ЭНДОТЕЛИЙ-ЗАВИСИМОЕ РАССЛАБЛЕНИЕ АРТЕРИЙ МАЛОГО КРУГА КРОВООБРАЩЕНИЯ У НОВОРОЖДЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

В экспериментах на легочных артериях поросят, кроликов и овец показано, что степень выраженности реакций эндотелий-зависимого расслабления в первые часы после рождения существенно меньше, чем на более поздних стадиях развития [15, 16, 67]. Есть основания полагать, что это связано с низкой биодоступностью NO у новорожденных из-за высокого содержания АФК в стенке артерий.

Так, в работе Morescroft и MacLean ацетилхолин вызывал выраженное расслабление артерий четырехдневных и взрослых кроликов, которое полностью устранялось ингибитором NO-синтаз L-NAME [15]. Кроме того, у четырехдневных животных L-NAME вызывал развитие спонтанного тонуса. Таким образом, у четырехдневных и

взрослых кроликов NO (1) является главным посредником эндотелий-зависимого расслабления легочных артерий и (2) проявляет выраженное антиконстрикторное влияние (препятствует развитию спонтанного тонуса). Однако у новорожденных кроликов (в первые 12 ч после рождения) L-NAME не влиял на тонус легочных артерий, а расслабление артерий в ответ на ацетилхолин развивалось только в присутствии SOD. Инкубация с SOD также приводила к ослаблению сокращения артерий новорожденных кроликов на агонист α_1 -адренорецепторов фенилэфрин, а удаление эндотелия устраняло данный эффект [15]. Авторы заключили, что вклад NO в эндотелий-зависимое расслабление, а также его антиконстрикторное влияние в ткани легочных артерий новорожденных кроликов снижены из-за накопления O_2^- , и, следовательно, снижения биодоступности NO. Помимо этого, $ONOO^-$, образующийся в результате взаимодействия O_2^- с NO, сам по себе способен вызывать сокращение. На легочных артериях новорожденных крыс было показано, что $ONOO^-$ может способствовать сокращению путем увеличения количества 8-изопростана, способного активировать рецепторы тромбоксана A_2 , а также путем активации сигнального пути Rho-киназы [68] (рис. 2, слева).

Накопление O_2^- может происходить в результате сниженной экспрессии/активности антиоксидантных систем, в том числе SOD. Показано, что активность и количество белка SOD существенно ниже в легочной ткани новорожденных кроликов по сравнению со взрослыми [69]. Сходным образом экспрессия мРНК SOD1 и SOD2 в легочной ткани человека увеличивалась по мере взросления [70]. Кроме того, содержание белка всех трех изоформ SOD в легочной ткани взрослых мышей выше, чем у мышей в возрасте 7 дней [71]. Активность SOD в легочной ткани кроликов существенно растет от момента рождения уже к возрасту 3–4 дней [62]. Вместе с тем активность SOD в ткани легких и продукция O_2^- в легочных артериях были сопоставимыми у новорожденных и двухнедельных поросят [67]. Отсутствие постнатальных изменений этих показателей у поросят может быть связано с их большей зрелостью к моменту рождения по сравнению с другими упоминавшимися выше млекопитающими, то есть изменения экспрессии/активности SOD у них могут происходить на конечном этапе внутриутробного развития.

В ходе развития могут изменяться не только активность и экспрессия ферментов, но и их локализация в ткани. Парадоксально, но в легких плодов и новорожденных кроликов внеклеточная SOD (SOD3) локализуется преимущественно в эпителиальных клетках дыхательных путей и альвеол [69]. Спустя неделю жизни она обнаруживается как внутри, так и вне клеток, а в возрасте 1 месяца и старше содержание SOD3 внутри клеток становится существенно меньше, нежели во внеклеточном матриксе [69]. Если аналогичные изменения локализации SOD3 происходят и в ткани легочных сосудов, это может быть еще одним объяснением увеличения биодоступности NO от момента рождения к более поздним стадиям онтогенеза.

Такое предположение согласуется с результатами функциональных исследований. Несмотря на отсутствие явных возрастных изменений общей активности SOD у поросят [67], ингибитор Cu,Zn -SOD (т.е. SOD1 и SOD3) DETCA подавлял реакции расслабления на ацетилхолин у новорожденных поросят и не оказывал влияния на реакции артерий двухнедельных животных, то есть эти изоформы SOD вовлечены в реализацию эндотелий-зависимого расслабления легочных артерий новорожденных, но не двухнедельных поросят [67]. Важно отметить, что инкубация легочных артерий новорожденных поросят с проникающей в клетку формой SOD (PEG-SOD, конъюгат SOD с полиэтиленгликолем) устраняла влияние DETCA на эндотелий-зависимое расслабление, тогда как непроникающая в клетку форма SOD такого влияния не оказывала [67]. Судя по всему, эндотелий-зависимому расслаблению легочных артерий новорожденных поросят способствуют изоформы

SOD, локализованные только внутри клетки, то есть поддержание биодоступности NO за счет дисмутации O_2^- в основном происходит во внутриклеточном, а не внеклеточном пространстве.

Анализ приведенных выше работ позволяет заключить, что новорожденный организм может быть особенно восприимчивым к окислительному стрессу из-за сниженной активности антиоксидантных систем, в частности, SOD (рис. 2, слева). Постепенное повышение экспрессии/активности SOD, а также изменение их локализации в ткани (переход из внутриклеточного компартмента во внеклеточную среду) являются важными механизмами увеличения вклада NO в регуляцию тонуса легочных артерий после рождения.

3.2. АФК УЧАСТВУЮТ В ЭНДОТЕЛИЙ-ЗАВИСИМОМ РАССЛАБЛЕНИИ АРТЕРИЙ МАЛОГО КРУГА КРОВООБРАЩЕНИЯ В ПЕРИОД РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА

Результаты работ на легочных артериях более зрелых животных (до 4 нед. после рождения) демонстрируют, что АФК могут принимать непосредственное участие в эндотелий-зависимом расслаблении (рис. 2, справа).

Устранение АФК путем инкубации легочных артерий 1–2-недельных поросят с проницаемыми для мембраны SOD-миметиком (перевод O_2^- в H_2O_2) и каталазой (перевод H_2O_2 в H_2O и O_2) приводило к существенному ослаблению вазодилатации на ацетилхолин [72, 73]. Интересно, что апоцинин, который ингибирует NOX, а также может служить “ловушкой” нерадикальных окислителей, таких как H_2O_2 [74, 75], вызывал сходные изменения реакций на ацетилхолин. Эти данные говорят о том, что АФК способствуют эндотелий-зависимому расслаблению на ацетилхолин в легочных артериях 1–2-недельных поросят.

Следует отметить, что существенных изменений вклада АФК в регуляцию расслабления легочных артерий поросят в период с первой по вторую неделю жизни не происходит. Эффекты проникающего в клетку SOD-миметика, PEG-каталазы и апоцинина на ацетилхолин-вызванное расслабление были сопоставимы в артериях 5–6-дневных и 12–13-дневных поросят. В соответствии с этим содержание белка SOD1, SOD2 и SOD3 в легочных артериях 5–6-дневных поросят не отличалось от 12-дневных [72, 76]. Что касается экспрессии NOX, количество белка NOX1 в легочных артериях поросят по одним данным не изменяется от 5–6-дневного к 12-дневному возрасту [76], а по другим сведениям несколько снижается [72]. При этом общее содержание белка p67phox (регуляторная субъединица, активирующая NOX2) растет от 5–6-дневного к 12-дневному возрасту, а содержание p67phox в мембранной фракции не изменяется [72]. Таким образом, с 1-ю по 2-ю неделю жизни в легочных артериях поросят содержание SOD не изменяется, тогда как однозначный вывод об изменении экспрессии NOX сделать сложно.

Механизм участия АФК в эндотелий-зависимом расслаблении легочных артерий в период раннего постнатального онтогенеза может быть связан с функционированием eNOS [77]. Показано, что легочные артерии овец в возрасте 4 нед. расслабляются на ацетилхолин и на Ca^{2+} -ионофор A23187 (также способствует активации eNOS) значительно лучше, чем артерии плодов на поздней стадии внутриутробного развития (E136). В обеих группах животных реакции расслабления на A23187 устранялись в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NAME, однако ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ действовал лишь на артерии плодов, но не 4-недельных овец. Последнее указывает на то, что у 4-недельных овец активация eNOS приводит к расслаблению с участием механизма, отличного от синтеза NO. Действительно, в эндотелиальных клетках плодов A23187 вызывал

преимущественно синтез NO, тогда как в клетках 4-недельных овец помимо NO в большом количестве продуцировались O_2^- и H_2O_2 . PEG-SOD и каталаза не влияли на вызванное A23187 расслабление артерий плодов, в то время как у 4-недельных овец инкубация с PEG-SOD приводила к усилению, а инкубация с комбинацией PEG-SOD и каталазы — к ослаблению дилататорных реакций на A23187. Результаты данного эксперимента позволяют заключить, что релаксация артерий 4-недельных животных, но не плодов, на A23187 связана с влиянием продуцируемого эндотелием H_2O_2 . Наконец, авторы продемонстрировали, что продукция АФК эндотелиальными клетками 4-недельных овец блокируется ингибитором NO-синтазы L-NAME, но не апоцинином (ингибитор NOX). Таким образом, в легочных артериях 4-недельных овец eNOS находится в разобщенном состоянии, что связано с низким содержанием BH_4 , и продуцирует преимущественно АФК, которые способствуют расслаблению [77].

Основываясь на данных литературы, можно предложить следующий механизм релаксирующего влияния АФК на легочные артерии молодых животных. С одной стороны, известно, что вазодилататоры, зависимые от активности циклооксигеназы (ЦОГ), вносят весомый вклад в эндотелий-зависимое расслабление легочных артерий поросят при действии ацетилхолина [78]. С другой стороны, как было показано на изолированных ГМК аорты крысы, H_2O_2 может вызывать активацию фосфолипазы A_2 и высвобождение арахидоновой кислоты [79]. Поэтому неудивительно, что АФК, генерируемые экзогенной ксантиноксидазой, или же экзогенный H_2O_2 вызвали расслабление ГМК артерий поросят, причем эти реакции уменьшались под действием ингибитора ЦОГ индометацина [80]. Более того, как ксантиноксидаза, так и H_2O_2 стимулировали продукцию простаглицлина в этих артериях. Таким образом, есть основание полагать, что в легочных артериях поросят АФК вызывают расслабление, стимулируя выработку зависимых от ЦОГ вазодилататорных метаболитов арахидоновой кислоты.

Итак, совокупность приведенных экспериментальных работ демонстрирует, что у более зрелых животных АФК способны принимать непосредственное участие в эндотелий-зависимом расслаблении: наряду с NO, АФК (в первую очередь H_2O_2) могут вызывать дилатацию легочных сосудов, возможно, с участием ЦОГ (рис. 2, справа).

3.3. АФК, ПРОДУЦИРУЕМЫЕ ГМК, СНИЖАЮТ РЕАКТИВНОСТЬ ЛЕГОЧНЫХ АРТЕРИЙ НА ЭКЗОГЕННЫЙ NO

Как известно, АФК-продуцирующие ферменты экспрессируются не только в эндотелии, но и в ГМК [3]. Следовательно, модуляция эффектов эндотелиального NO под действием АФК может происходить и на уровне ГМК. Есть основания полагать, что эти процессы происходят по-разному у новорожденных и более зрелых животных.

Работа Perez-Vizcaino и соавт. была посвящена сравнению реакций легочных артерий новорожденных (в течение 18 ч после рождения) и 15–20-дневных поросят на экзогенный NO и определению роли АФК в этих реакциях [81]. Важно отметить, что все эксперименты были проведены на сосудах с удаленным эндотелием. Артерии новорожденных поросят расслаблялись на газообразный NO существенно хуже по сравнению с артериями более взрослых поросят. При этом расслабление на NO в обеих группах полностью устранялось ингибитором растворимой гуанилатциклазы ODQ, что говорит о запуске классического сигнального цГМФ-зависимого каскада в ГМК.

Исследователи выдвинули гипотезу о том, что ослабленные реакции артерий новорожденных поросят на NO связаны с большей активностью систем, генерирующих O_2^- , или же с меньшей активностью антиоксидантных систем в гладкой мышце. Инкубация артерий как с непроникающей в клетку SOD, так и с проникающим в клетку SOD-миметиком приводила к усилению реакций расслабления на NO в обеих группах, что указывает на большую сохранность NO на фоне данных веществ, однако степень выраженности эффектов SOD/SOD-миметика была одинакова в артериях новорожденных и более взрослых животных [81]. Вещества, увеличивающие количество O_2^- (комплекс ксантинооксидазы с гипоксантином и ингибитор Cu,Zn-SOD DETCA), напротив, ослабляли реакции на NO в обеих группах, что указывает на разрушение NO под действием O_2^- . При этом эффекты данных веществ также были сопоставимы в сосудах животных двух возрастных групп [81]. Результаты данного исследования позволяют заключить, что менее выраженная реакция расслабления гладкой мышцы легочных артерий на экзогенный NO у новорожденных животных не связана с влиянием SOD.

Вместе с тем оказалось, что у новорожденных, но не более взрослых животных, расслабление на NO усиливается на фоне ингибитора ЦОГ-1 [81]. Исходя из того, что ЦОГ-зависимые пути способны активировать синтез АФК [82, 83], можно предположить, что сниженная реактивность артерий новорожденных поросят на NO связана с повышенной продукцией АФК как побочных продуктов более активной у них гладкомышечной ЦОГ-1 (рис. 2, слева).

Кроме того, показаны возрастные различия в эффектах NOX: ингибитор NOX DPI в большей степени усиливал расслабление артерий на NO в группе 15–20-дневных поросят по сравнению с новорожденными [81]. Хотя это и не объясняет описанные выше возрастные особенности реактивности сосудов на NO [81], но указывает на повышение вклада NOX, локализованных в ГМК, в регуляцию тонуса легочных артерий в ходе постнатального онтогенеза.

Интересно, что экзогенный NO из разных источников инактивируется АФК неодинаково. Показано, что газообразный NO в гораздо большей степени инактивируется O_2^- , нежели NO, высвобождаемый уже в ткани из NO-доноров SNP или SNAP [84]. Авторы предполагают, что NO, источником которого являются SNP и SNAP, образуется в компартментах клетки, отличных от компартмента образования супероксида. Вероятно, с этим связано отсутствие различий в расслаблении легочных артерий новорожденных и 15–20-дневных поросят на SNP [81], а также отсутствие эффектов SOD, тирона (“ловушки” O_2^-), ингибиторов NOX и каталазы на SNAP-вызванное расслабление легочных артерий плодов овец и крыс [85–87].

Итак, результаты приведенных исследований демонстрируют, что АФК, продуцируемые ГМК, также способны снижать биодоступность NO, что особенно ярко проявляется в период новорожденности.

4. РОЛЬ АФК В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА СИСТЕМНЫХ АРТЕРИЙ В ПЕРИНАТАЛЬНЫЙ И РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОДЫ ОНТОГЕНЕЗА

В целом функциональная роль АФК в артериях большого круга кровообращения, играющих ключевую роль в регуляции системного артериального давления, в перинатальный и ранний постнатальный периоды онтогенеза исследована в значительно меньшей степени по сравнению с легочными сосудами и АП. Однако точно известно, что АФК принимают участие в реализации важной реакции, защищающей головной мозг плода от острой гипоксии во время родов (т.н. brain-sparing effect) [88]. У плодов овец эта реакция формируется к концу периода гестации (на-

чая с E110) и заключается в сужении периферических сосудов, которое необходимо для перераспределения крови в пользу головного мозга с целью снабжения его кислородом в условиях гипоксии. В ней задействованы как системные нейрогуморальные механизмы, запускаемые в основном хеморецепторами каротидных синусов, так и механизмы местной регуляции сосудистого тонуса, которые реализуются с участием АФК [88].

Известно, что у взрослых птиц и млекопитающих гипоксия вызывает сужение сосудов легких [89], но расширение сосудов системного кровообращения [90]. Однако, как будет рассмотрено далее, на позднем этапе внутриутробного развития периферические сосуды плода демонстрируют противоположные изменения тонуса — сужение в ответ на гипоксию. В экспериментах на беременных самках и плодах овец (срок гестации — около E130) с хронически имплантированными катетерами и датчиками кровотока дыхание матери гипоксической газовой смесью (6% O₂ в течение 30 мин, двукратное снижение оксигенации артериальной крови плода) приводило к повышению у плода артериального давления и сопротивления сосудистого бассейна бедренной артерии [91, 92]. Такое сужение сосудов плода значительно уменьшалось под действием аскорбиновой кислоты или ингибитора ксантиноксидазы, причем блокада синтеза NO (введение L-NAME) отменяла эффекты обоих антиоксидантов [91, 92].

Полученные результаты позволили авторам сформулировать положение о развитии у плода “оксидантного тонуса” периферических сосудов: гипоксия при прямом воздействии на сосуды приводит к генерации в них АФК, которые снижают биодоступность продуцируемого эндотелием NO. Следует также отметить, что введение аллопуринола (ингибитор ксантиноксидазы) сопровождалось снижением у плода артериального давления и в отсутствие гипоксии, что указывает на участие АФК в формировании базальных уровней периферического сопротивления и системного артериального давления в позднем пренатальном онтогенезе [92].

Артерии брыжейки куриных эмбрионов также сокращаются в ответ на гипоксию (наиболее выражено в период с E21 по P3), но механизмы этой реакции принципиально иные, чем у млекопитающих [93]. Гипоксическое сужение артерий куриных эмбрионов реализуется независимо от эндотелия (сохраняется после его удаления или в присутствии L-NAME) и включает два компонента: фазический, который наблюдается в течение начальных 10 мин и затем сменяется тоническим. При этом только фазический, но не тонический компонент выражено уменьшался под действием ингибиторов ЭТЦ митохондрий (ротенона и антимицина), а также ингибитора NOX VAS2870, но не изменялся в присутствии непроницающих в клетку форм SOD и каталазы [93]. Таким образом, в артериях брыжейки куриных эмбрионов АФК могут обеспечивать быстрое и транзитное сокращение ГМК в ответ на гипоксию, реализуя свое влияние внутри клетки. По данным фармакологического анализа, потенциальными мишенями АФК в ГМК артерий куриных эмбрионов могут служить потенциал-управляемые кальциевые каналы L-типа, Rho-киназа и некоторые другие регуляторные молекулы [93].

Интересно, что бедренная артерия куриных эмбрионов (E19), напротив, расслабляется в ответ на гипоксию, однако, по мнению авторов, АФК не принимают значимого участия в развитии этой реакции [94]. В этой же работе было показано, что ингибиторы ЭТЦ митохондрий не оказывают влияния на реакции расслабления артерий, развивающиеся по различным механизмам: при действии ацетилхолина (эндотелий-зависимое расслабление), донора NO SNP и форсколина (активатор аденилатциклазы). Вместе с тем ингибиторы ЭТЦ митохондрий несколько уменьшали сократительные реакции артерий в ответ на норадреналин, что указывает на возможное просократительное влияние АФК в ГМК бедренной артерии ку-

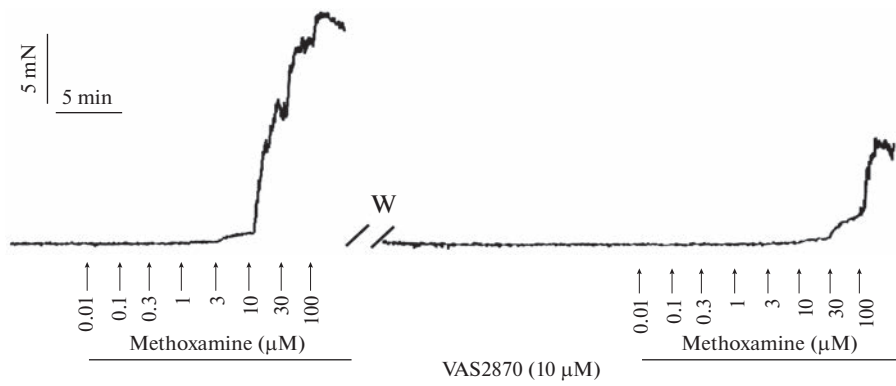


Рис. 3. Оригинальная запись эксперимента на подкожной артерии крысенка в возрасте 2-х недель. Приведены две зависимости “концентрация—эффект” на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин (methoxamine), вторая из зависимостей была получена в присутствии ингибитора NOX VAS2870. Инкубация препарата с VAS2870 (10 мкМ) приводит к значительному ослаблению сократительных ответов. W – washout (отмывка).

риных эмбрионов при активации внутриклеточных сигнальных путей агонистами мембранных рецепторов [94].

Следует отметить, что фетальный фенотип сосудистой реакции на гипоксию проявляется и в течение некоторого времени после рождения. Было показано, что изолированные артерии брыжейки 3-дневных поросят также сокращаются при снижении содержания O_2 в окружающей среде, тогда как в возрасте 35 дней сокращение сменяется расслаблением [95]. Как и у плодов овец, гипоксическое сужение артерий новорожденных поросят исчезает после блокады синтеза NO, а также после удаления эндотелия, то есть связано с инактивацией эндотелиального NO.

Не исключено, что вазомоторное влияние АФК может сохраняться и после третьего дня постнатального развития, особенно у млекопитающих, детеныши которых рождаются сравнительно незрелыми. Результаты работ на культурах ГМК, выделенных из системных артерий человека и лабораторных грызунов, демонстрируют важную роль АФК в формировании сократительного фенотипа ГМК [10, 11]. Следует отметить, что артерии головного мозга [96] и кожи [19] 2-недельных крысят по содержанию сократительных и регуляторных белков, маркирующих сократительный фенотип ГМК, еще значительно отличаются от артерий взрослых крыс. Логично предположить, что в этом возрасте у крыс может проявляться участие АФК в регуляции тонуса периферических сосудов.

Действительно, по нашим данным, ингибитор NOX VAS2870 существенно ослабляет сократительные ответы подкожной артерии крысят в возрасте двух недель (рис. 3). Это говорит о том, что продуцируемые NOX АФК обладают выраженным проконстрикторным влиянием в сосудистом русле кожи у крыс, по крайней мере, в первые две недели после рождения. Учитывая, что у 1–2-недельных крысят [97] кожный кровоток составляет до 20% сердечного выброса, вазомоторное влияние АФК может проявляться у них и на системном уровне. Безусловно, для ответа на вопрос о механизмах влияния АФК на тонус периферических сосудов в период раннего постнатального онтогенеза необходимы дальнейшие исследования. Подсказками на этом сложном пути могут служить характерные для системных артерий развивающегося организма особенности функционирования вазомоторных механизмов [12, 13, 18, 19], которые могут подвергаться регуляции со стороны АФК [2, 3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, важная роль АФК в регуляции тонуса сосудов в период раннего постнатального онтогенеза не вызывает сомнений, однако характер их вазомоторного влияния может различаться в легочных и системных сосудах, а также на разных стадиях онтогенеза. В перинатальном онтогенезе (на поздней стадии внутриутробного развития и в течение первых часов и суток после рождения) во всех отделах сосудистой системы преобладает констрикторное влияние АФК, а на более поздних этапах знак их влияния может изменяться.

Индуктируемое нормоксией повышение продукции АФК обеспечивает сокращение АП, необходимое для направления крови к легким после рождения. В легочном круге новорожденного организма действием АФК объясняется ослабление реакций эндотелий-зависимого расслабления в результате снижения биодоступности NO. Мы полагаем, что это отражает “следовое” влияние АФК в первые дни жизни: как известно, они способствуют поддержанию высокого сопротивления легочных сосудов в пренатальный период [57]. Механизмы этого явления связаны с функционированием ферментов, обеспечивающих синтез и деградацию АФК и, вероятно, видоспецифичны (в том числе, в связи с разной степенью зрелости организма на момент рождения). Низкая биодоступность NO в легочных артериях новорожденных кроликов по большей части связана с низкой экспрессией/активностью антиоксидантных систем (в частности, SOD). Поскольку в легких человека и грызунов содержание SOD также растет по мере взросления, у этих видов может работать сходный механизм снижения биодоступности NO в период новорожденности. С другой стороны, у новорожденных поросят низкая биодоступность NO может быть связана с высокой продукцией АФК, в частности, как побочных продуктов локализованной в ГМК ЦОГ-1. Подобные условия создают риск развития патологических состояний, например, кислородно-радикального заболевания новорожденных (“oxygen radical disease in newborn”) [64]. Возможно, в качестве компенсации у новорожденных животных сформировался механизм защиты NO от разрушения под действием АФК, проявляющийся в большей экспрессии и функциональном вкладе SOD3 внутри клетки, а не во внеклеточном пространстве, как у зрелых животных.

На более поздних этапах онтогенеза (в возрасте от 1-ой до 4-х недель) АФК, в частности, H_2O_2 , напротив, могут принимать непосредственное участие в реализации эндотелий-зависимого расслабления легочных сосудов. Иными словами, влияние АФК служит одним из механизмов постепенного увеличения способности легочных сосудов к дилатации, что необходимо для снижения давления в малом круге кровообращения. Данный факт необходимо учитывать ввиду часто применяемой в клинике антиоксидантной терапии в ранний постнатальный период [98, 99].

Наконец, в системных сосудах на поздних стадиях внутриутробного развития АФК обеспечивают важнейшую защитную реакцию от гипоксии, сопровождающей процесс родов. Гипоксия напрямую вызывает сокращение периферических сосудов плода, что способствует перераспределению крови к головному мозгу, тем самым защищая его от повреждающего гипоксического влияния. Доказано, что данный процесс происходит с участием АФК. АФК сохраняют вазомоторное влияние в периферических системных сосудах и на более поздних стадиях раннего постнатального онтогенеза, однако этот вопрос требует дальнейших исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании, результаты которого приведены на рис. 3, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтической комиссии МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол № 149-а от 20.04.2023 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00056).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данного обзора.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А.Ш., Д.К.Г. и О.С.Т. разработали концепцию обзора, написали, прочитали и одобрили представленную версию текста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brown DI, Griendling KK* (2015) Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res* 116: 531–549.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303584>
2. *Knock GA* (2019) NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension. *Free Radic Biol Med* 145: 385–427.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.029>
3. *Tejero J, Shiva S, Gladwin MT* (2019) Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiol Rev* 99: 311–379.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>
4. *Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F* (2018) Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol* 100: 1–19.
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>
5. *Zhang Y, Murugesan P, Huang K, Cai H* (2020) NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol* 17: 170–194.
<https://doi.org/10.1038/s41569-019-0260-8>
6. *Borzykh AA, Shvetsova AA, Kuzmin IV, Buravkov SV, Gaynullina DK, Tarasova OS* (2021) The Role of Reactive Oxygen Species in the Tone Regulation of Respiratory and Locomotor Muscle Arteries of the Rat. *Moscow Univ Biol Sci Bull* 76: 111–117.
<https://doi.org/10.3103/S0096392521030020>
7. *Bedard K, Krause KH* (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245–313.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
8. *Mittal M, Urao N, Hecquet CM, Zhang M, Sudhakar V, Gao XP, Komarova Y, Ushio-Fukai M, Malik AB* (2015) Novel role of reactive oxygen species-activated trp melastatin channel-2 in mediating angiogenesis and postischemic neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35: 877–887.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304802>
9. *Chen C, Li L, Zhou HJ, Min W* (2017) The role of NOX4 and TRX2 in angiogenesis and their potential cross-talk. *Antioxidants* 6(2): 42.
<https://doi.org/10.3390/antiox6020042>
10. *Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Lassègue B, Griendling KK* (2007) Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 42–48.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000251500.94478.18>
11. *Xiao Q, Luo Z, Pepe AE, Margariti A, Zeng L, Xu Q* (2009) Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by Nox4-produced H₂O₂. *Am J Physiol – Cell Physiol* 296(4): C711–C723.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00442.2008>
12. *Shvetsova AA, Gaynullina DK, Tarasova OS, Schubert R* (2021) Remodeling of Arterial Tone Regulation in Postnatal Development: Focus on Smooth Muscle Cell Potassium Channels. *Int J Mol Sci* 22: 5413.
<https://doi.org/10.3390/ijms22115413>
13. *Gaynullina DK, Schubert R, Tarasova OS* (2019) Changes in endothelial nitric oxide production in systemic vessels during early ontogenesis—A key mechanism for the perinatal adaptation of

- the circulatory system. *Int J Mol Sci* 20: 1–12.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061421>
14. *Evans AM, Osipenko ON, Haworth SG, Gurney AM* (1998) Resting potentials and potassium currents during development of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 275: H887–H899.
 15. *Morecroft I, MacLean MR* (1998) Developmental changes in endothelium-dependent vasodilation and the influence of superoxide anions in perinatal rabbit pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 125: 1585–1593.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702217>
 16. *Kolber KA, Gao Y, Raj JU* (2000) Maturation changes in endothelium-derived nitric oxide-mediated relaxation of ovine pulmonary arteries. *Biol Neonate* 77: 123–130.
<https://doi.org/10.1159/000014206>
 17. *Belik J, Kerc E, Pato MD* (2006) Rat pulmonary arterial smooth muscle myosin light chain kinase and phosphatase activities decrease with age. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 290: 509–516.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00145.2005>
 18. *Mochalov SV, Tarasova NV, Kudryashova TV, Gaynullina DK, Kalenchuk VU, Borovik AS, Vorotnikov AV, Tarasova OS, Schubert R* (2018) Higher Ca^{2+} -sensitivity of arterial contraction in 1-week-old rats is due to a greater Rho-kinase activity. *Acta Physiol* 12: e13044.
<https://doi.org/10.1111/apha.13044>
 19. *Puzdrowa VA, Kudryashova TV, Gaynullina DK, Mochalov SV, Aalkjaer C, Nilsson H, Vorotnikov AV, Schubert R, Tarasova OS* (2014) Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle Ca^{2+} sensitivity during early post-natal development in rats. *Acta Physiol* 212: 128–141.
<https://doi.org/10.1111/apha.12331>
 20. *Murphy MP* (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417: 1–13.
<https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
 21. *Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E* (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278: 5557–5563.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M210269200>
 22. *Veit F, Pak O, Egemnazarov B, Roth M, Kosanovic D, Seimetz M, Sommer N, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Brandes RP, Schermuly RT, Weissmann N* (2013) Function of NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial smooth muscle cells after monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal* 19: 2213–2231.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4904>
 23. *Hawkins BJ, Madesh M, Kirkpatrick CJ, Fisher AB* (2007) Superoxide Flux in Endothelial Cells via the Chloride Channel-3 Mediates Intracellular Signaling. *Mol Biol Cell* 18: 2002–2012.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e06-09-0830>
 24. *Bienert GP, Møller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, Jahn TP* (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* 282: 1183–1192.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M603761200>
 25. *Al Ghouleh I, Frazziano G, Rodriguez AI, Csányi G, Maniar S, St Croix CM, Kelley EE, Egaña LA, Song GJ, Bisello A, Lee YJ, Pagano PJ* (2013) Aquaporin 1, Nox1, and Ask1 mediate oxidant-induced smooth muscle cell hypertrophy. *Cardiovasc Res* 97: 134–142.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvs295>
 26. *Chen F, Pandey D, Chadli A, Catravas JD, Chen T, Fulton DJR* (2011) Hsp90 regulates NADPH oxidase activity and is necessary for superoxide but not hydrogen peroxide production. *Antioxid Redox Signal* 14: 2107–2119.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3669>
 27. *Fukai T, Ushio-Fukai M* (2011) Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15: 1583–1606.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>
 28. *Snetkov VA, Smirnov SV, Kua J, Aaronson PI, Ward JPT, Knock GA* (2011) Superoxide differentially controls pulmonary and systemic vascular tone through multiple signalling pathways. *Cardiovasc Res* 89: 214–224.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvq275>
 29. *Kendrick DJ, Mishra RC, John CM, Zhu HL, Braun AP* (2022) Effects of Pharmacological Inhibitors of NADPH Oxidase on Myogenic Contractility and Evoked Vasoactive Responses in Rat Resistance Arteries. *Front Physiol* 12: 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.752366>
 30. *Jin L, Ying Z, Webb RC* (2004) Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol – Hear Circ Physiol* 287: 1495–1500.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01006.2003>

31. Li L, Lai EY, Wellstein A, Welch WJ, Wilcox CS (2016) Differential effects of superoxide and hydrogen peroxide on myogenic signaling, membrane potential, and contractions of mouse renal afferent arterioles. *Am J Physiol – Renal Physiol* 310: F1197–F1205.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00575.2015>
32. Ding Y, Winters A, Ding M, Graham S, Akopova I, Muallem S, Wang Y, Hong JH, Gryczynski Z, Yang SH, Birnbaumer L, Ma R (2011) Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone. *J Biol Chem* 286: 31799–31809.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.248344>
33. Leung HS, Leung FP, Yao X, Ko WH, Chen ZY, Vanhoutte PM, Huang Y (2006) Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery. *Vascul Pharmacol* 44: 299–308.
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.01.010>
34. Gao YJ, Hirota S, Zhang DW, Janssen LJ, Lee RMKW (2003) Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 138: 1085–1092.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705147>
35. Santiago E, Contreras C, García-Sacristán A, Sánchez A, Rivera L, Climent B, Prieto D (2013) Signaling pathways involved in the H₂O₂-induced vasoconstriction of rat coronary arteries. *Free Radic Biol Med* 60: 136–146.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.014>
36. Sotníková R (1998) Investigation of the mechanisms underlying H₂O₂-evoked contraction in the isolated rat aorta. *Gen Pharmacol* 31: 115–119.
[https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(97\)00392-3](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00392-3)
37. Vogel PA, Yang X, Moss NG, Arendshorst WJ (2015) Superoxide Enhances Ca²⁺ Entry Through L-Type Channels in the Renal Afferent Arteriole. *Hypertension* 66: 374–381.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05274>
38. Hu Q, Zheng G, Zweier JL, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein RC (2000) NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca²⁺ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 15749–15757.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M000381200>
39. Michelakis ED, Rebeyka I, Wu XC, Nsair A, Thébaud B, Hashimoto K, Dyck JRB, Haromy A, Harry G, Barr A, Archer SL (2002) O₂ sensing in the human ductus arteriosus: Regulation of voltage-gated K⁺ channels in smooth muscle cells by a mitochondrial redox sensor. *Circ Res* 91: 478–486.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000035057.63303.D1>
40. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK (1998) p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 273: 15022–15029.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.15022>
41. Touyz RM, Deschepper C, Park JB, He G, Chen X, Neves MFT, Virdis A, Schiffrin EL (2002) Inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase improves endothelial function and attenuates Ang II-induced contractility of mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 20: 1127–1134.
<https://doi.org/10.1097/00004872-200206000-00024>
42. Knock GA, Snetkov VA, Shaifita Y, Connolly M, Drndarski S, Noah A, Pourmahram GE, Becker S, Aaronson PI, Ward JPT (2009) Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization. *Free Radic Biol Med* 46: 633–642.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.015>
43. Mackay CE, Knock GA (2015) Control of vascular smooth muscle function by Src-family kinases and reactive oxygen species in health and disease. *J Physiol* 593: 3815–3828.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.285304>
44. Burgoyne JR, Prysyazhna O, Rudyk O, Eaton P (2012) CGMP-dependent activation of protein kinase g precludes disulfide activation: Implications for blood pressure control. *Hypertension* 60: 1301–1308.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198754>
45. Zhang DX, Borbouse L, Gebremedhin D, Mendoza SA, Zinkevich NS, Li R, Gutterman DD (2012) H₂O₂-induced dilation in human coronary arterioles: Role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *Circ Res* 110: 471–480.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.258871>
46. Гайнуллина ДК, Кирюхина ОО, Тарасова ОС (2013) Оксид азота в эндотелии сосудов: регуляция продукции и механизмы действия. *Успехи физиол наук* 44: 88–102. [Gainullina DK, Kiryukhina OO, Tarasova OS (2013) Nitric oxide in the vascular endothelium: regulation of production and mechanisms of action. *Uspekhi fiziol nauk* 44: 88–102. (In Russ)].

47. *McMurphy DM, Heymann MA, Rudolph AM, Melmon KL* (1972) Developmental changes in constriction of the ductus arteriosus: Responses to oxygen and vasoactive agents in the isolated ductus arteriosus of the fetal lamb. *Pediatr Res* 6: 231–238.
<https://doi.org/10.1203/00006450-197204000-00004>
48. *Olschewski A, Hong Z, Peterson DA, Nelson DP, Porter VA, Weir EK* (2004) Opposite effects of redox status on membrane potential, cytosolic calcium, and tone in pulmonary arteries and ductus arteriosus. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 286: 15–22.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00372.2002>
49. *Cogolludo AL, Moral-Sanz J, Van Der Sterren S, Frazziano G, Van Cleef ANH, Menéndez C, Zoer B, Moreno E, Roman A, Pérez-Vizcaino F, Villamor E* (2009) Maturation of O₂ sensing and signaling in the chicken ductus arteriosus. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 297: 619–630.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00092.2009>
50. *Villamor E, Moreno L, Mohammed R, Pérez-Vizcaino F, Cogolludo A* (2019) Reactive oxygen species as mediators of oxygen signaling during fetal-to-neonatal circulatory transition. *Free Radic Biol Med* 142: 82–96.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.008>
51. *Reeve HL, Tolarova S, Nelson DP, Archer S, Kenneth Weir E* (2001) Redox control of oxygen sensing in the rabbit ductus arteriosus. *J Physiol* 533: 253–261.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0253b.x>
52. *Tarasova OS, Gaynullina DK* (2017) Rho-kinase as a key participant in the regulation of vascular tone in normal circulation and vascular disorders. *Arter Hypertens* 23: 383–394.
<https://doi.org/10.18705/1607-419X-2017-23-5-383-394>
53. *Kajimoto H, Hashimoto K, Bonnet SN, Haromy A, Harry G, Moudgil R, Nakanishi T, Rebeyka I, Thébaud B, Michelakis ED, Archer SL* (2007) Oxygen activates the rho/rho-kinase pathway and induces RhoB and ROCK-1 expression in human and rabbit ductus arteriosus by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species: A newly recognized mechanism for sustaining ductal constriction. *Circulation* 115: 1777–1788.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.649566>
54. *Dzialowski EM* (2018) Comparative physiology of the ductus arteriosus among vertebrates. *Semin Perinatol* 42: 203–211.
<https://doi.org/10.1053/j.semperi.2018.05.002>
55. *Bergwerff M, DeRuiter MC, Gittenberger-De Groot AC* (1999) Comparative anatomy and ontogeny of the ductus arteriosus, a vascular outsider. *Anat Embryol (Berl)* 200: 559–571.
<https://doi.org/10.1007/s004290050304>
56. *Dumitru CA, Zhang Y, Li X, Gulbins E* (2007) Ceramide: A novel player in reactive oxygen species-induced signaling? *Antioxid Redox Signal* 9: 1535–1540.
<https://doi.org/10.1089/ars.2007.1692>
57. *Moreno L, Moral-Sanz J, Morales-Cano D, Barreira B, Moreno E, Ferrarini A, Pandolfi R, Ruperez FJ, Cortijo J, Sanchez-Luna M, Villamor E, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A* (2014) Ceramide mediates acute oxygen sensing in vascular tissues. *Antioxid Redox Signal* 20: 1–14.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4752>
58. *Frazziano G, Moreno L, Moral-Sanz J, Menendez C, Escolano L, Gonzalez C, Villamor E, Alvarez-Sala JL, Cogolludo AL, Perez-Vizcaino F* (2011) Neutral sphingomyelinase, NADPH oxidase and reactive oxygen species. Role in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Cell Physiol* 226: 2633–2640.
<https://doi.org/10.1002/jcp.22611>
59. *Clyman RI, Waleh N, Kajino H, Roman C, Mauray F* (2007) Calcium-dependent and calcium-sensitizing pathways in the mature and immature ductus arteriosus. *Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol* 293: 1650–1656.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00300.2007>
60. *Thébaud B, Wu XC, Kajimoto H, Bonnet S, Hashimoto K, Michelakis ED, Archer SL* (2008) Developmental absence of the O₂ sensitivity of L-type calcium channels in preterm ductus arteriosus smooth muscle cells impairs O₂ constriction contributing to patent ductus arteriosus. *Pediatr Res* 63: 176–181.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31815ed059>
61. *Waleh N, Reese J, Kajino H, Roman C, Seidner S, McCurnin D, Clyman RI* (2009) Oxygen-induced tension in the sheep ductus arteriosus: Effects of gestation on potassium and calcium channel regulation. *Pediatr Res* 65: 285–290.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819746a1>
62. *Frank L, Groseclose EE* (1984) Preparation for birth into an O₂-rich environment: The antioxidant enzymes in the developing rabbit lung. *Pediatr Res* 18: 240–244.
<https://doi.org/10.1203/00006450-198403000-00004>

63. Friel JK, Friesen RW, Harding SV, Roberts LJ (2004) Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants. *Pediatr Res* 56: 878–882.
<https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000146032.98120.43>
64. Perez M, Robbins ME, Revhaug C, Saugstad OD (2019) Oxygen radical disease in the newborn, revisited: Oxidative stress and disease in the newborn period. *Free Radic Biol Med* 142: 61–72.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.035>
65. Shaito A, Aramouni K, Assaf R, Parenti A, Orekhov A, Yazbi A El, Pintus G, Eid AH (2022) Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Front Biosci – Landmark* 27(3): 105.
<https://doi.org/10.31083/j.fbl2703105>
66. Wedgwood S, Steinhorn RH (2014) Role of reactive oxygen species in neonatal pulmonary vascular disease. *Antioxid Redox Signal* 21: 1926–1942.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5785>
67. Villamor E, Kessels CGA, Fischer MAJ, Bast A, De Mey JGR, Blanco CE (2003) Role of superoxide anion on basal and stimulated nitric oxide activity in neonatal piglet pulmonary vessels. *Pediatr Res* 54: 372–381.
<https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000077481.15081.C8>
68. Belik J, Jankov RP, Pan J, Tanswell AK (2004) Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat. *Free Radic Biol Med* 37: 1384–1392.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.029>
69. Nozik-Grayck EVA, Dieterle CS, Piantadosi CA, Enghild JJ, Oury TD (2000) Secretion of extracellular superoxide dismutase in neonatal lungs. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 279: 977–984.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.5.1977>
70. Asikainen TM, Raivio KO, Saksela M, Kinnula VL (1998) Expression and developmental profile of antioxidant enzymes in human lung and liver. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 942–949.
<https://doi.org/10.1165/ajrcmb.19.6.3248>
71. Berkelhamer SK, Kim GA, Radder JE, Wedgwood S, Czech L, Steinhorn RH, Schumacker PT (2013) Developmental differences in hyperoxia-induced oxidative stress and cellular responses in the murine lung. *Free Radic Biol Med* 61: 51–60.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.003>
72. Dennis KE, Aschner JL, Milatovic D, Schmidt JW, Aschner M, Kaplowitz MR, Zhang Y, Fike CD (2009) NADPH oxidases and reactive oxygen species at different stages of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 297: 596–607.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.90568.2008>
73. Fike CD, Slaughter JC, Kaplowitz MR, Zhang Y, Aschner JL (2008) Reactive oxygen species from NADPH oxidase contribute to altered pulmonary vascular responses in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 295: 881–888.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00047.2008>
74. Savla SR, Laddha AP, Kulkarni YA (2021) Pharmacology of apocynin: a natural acetophenone. *Drug Metab Rev* 53: 542–562.
<https://doi.org/10.1080/03602532.2021.1895203>
75. Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HHHW, Busse R, Schröder K, Brandes RP (2008) Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 51: 211–217.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100214>
76. Fike CD, Dikalova A, Slaughter JC, Kaplowitz MR, Zhang Y, Aschner JL (2013) Reactive oxygen species-reducing strategies improve pulmonary arterial responses to nitric oxide in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Antioxid Redox Signal* 18: 1727–1738.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4823>
77. Mata-Greenwood E, Jenkins C, Farrow KN, Konduri GG, Russell JA, Lakshminrusimha S, Black SM, Steinhorn RH (2006) eNOS function is developmentally regulated: Uncoupling of eNOS occurs postnatally. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 290: 232–241.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00393.2004>
78. Fike CD, Aschner JL, Zhang Y, Kaplowitz MR (2004) Impaired NO signaling in small pulmonary arteries of chronically hypoxic newborn piglets. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 286: 1244–1254.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00345.2003>
79. Rao GN, Runge MS, Alexander RW (1995) Hydrogen peroxide activation of cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res* 1265: 67–72.
[https://doi.org/10.1016/0167-4889\(95\)91997-Z](https://doi.org/10.1016/0167-4889(95)91997-Z)
80. Fike CD, Aschner JL, Slaughter JC, Kaplowitz MR, Zhang Y, Pfister SL (2011) Pulmonary arterial responses to reactive oxygen species are altered in newborn piglets with chronic hypoxia-in-

- duced pulmonary hypertension. *Pediatr Res* 70: 136–141.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3182207ce7>
81. Pérez-Vizcaino F, López-López JG, Santiago R, Cogolludo A, Zaragoza-Arnández F, Moreno L, Alonso MJ, Salas M, Tamargo J (2002) Postnatal maturation in nitric oxide-induced pulmonary artery relaxation involving cyclooxygenase-1 activity. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 283: 839–848.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00293.2001>
 82. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu Rev Biochem* 69: 145–182.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>
 83. Hernanz R, Briones AM, Salas M, Alonso MJ (2014) New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin Sci* 126: 111–121.
<https://doi.org/10.1042/CS20120651>
 84. López-López JG, Pérez-Vizcaino F, Cogolludo AL, Ibarra M, Zaragoza-Arnández F, Tamargo J (2001) Nitric oxide- and nitric oxide donors-induced relaxation and its modulation by oxidative stress in piglet pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 133: 615–624.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704103>
 85. Brennan LA, Steinhorn RH, Wedgwood S, Mata-Greenwood E, Roark EA, Russell JA, Black SM (2003) Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: A role for NADPH oxidase. *Circ Res* 92: 683–691.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000063424.28903.BB>
 86. Wedgwood S, Steinhorn RH, Bunderson M, William J, Lakshminrusimha S, Brennan LA, Black SM (2005) Increased hydrogen peroxide downregulates soluble guanylate cyclase in the lungs of lambs with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol* 289: 660–666.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00369.2004>
 87. Guo J, Yu X, Liu Y, Lu L, Zhu D, Zhang Y, Li L, Zhang P, Gao Q, Lu X, Sun M (2022) Prenatal hypothyroidism diminished exogenous NO-mediated diastolic effects in fetal rat thoracic aorta smooth muscle via increased oxidative stress. *Reprod Toxicol* 113: 52–61.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.08.009>
 88. Giussani DA (2016) The fetal brain sparing response to hypoxia: Physiological mechanisms. *J Physiol* 594: 1215–1230.
<https://doi.org/10.1113/JP271099>
 89. Sommer N, Strielkov I, Pak O, Weissmann N (2016) Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur Respir J* 47: 288–303.
<https://doi.org/10.1183/13993003.00945-2015>
 90. Jackson WF (2016) Arteriolar oxygen reactivity: where is the sensor and what is the mechanism of action? *J Physiol* 594: 5055–5077.
<https://doi.org/10.1113/JP270192>
 91. Thakor AS, Richter HG, Kane AD, Dunster C, Kelly FJ, Poston L, Giussani DA (2010) Redox modulation of the fetal cardiovascular defence to hypoxaemia. *J Physiol* 588: 4235–4247.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.196402>
 92. Kane AD, Hansell JA, Herrera EA, Allison BJ, Niu Y, Brain KL, Kaandorp JJ, Derks JB, Giussani DA (2014) Xanthine oxidase and the fetal cardiovascular defence to hypoxia in late gestation ovine pregnancy. *J Physiol* 592: 475–489.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264275>
 93. Brinks L, Moonen RMJ, Moral-Sanz J, Barreira B, Kessels L, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Villamor E (2016) Hypoxia-induced contraction of chicken embryo mesenteric arteries: Mechanisms and developmental changes. *Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol* 311: R858–R869.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00461.2015>
 94. Zoer B, Cogolludo AL, Perez-Vizcaino F, De Mey JGR, Blanco CE, Villamor E (2010) Hypoxia sensing in the fetal chicken femoral artery is mediated by the mitochondrial electron transport chain. *Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol* 298: 1026–1034.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00500.2009>
 95. Nankervis CA, Miller CE (1998) Developmental differences in response of mesenteric artery to acute hypoxia in vitro. *Am J Physiol – Gastrointest Liver Physiol* 274(4): G694–G699.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.4.g694>
 96. Charles SM, Zhang L, Cipolla MJ, Buchholz JN, Pearce WJ (2010) Roles of cytosolic Ca^{2+} concentration and myofilament Ca^{2+} sensitization in age-dependent cerebrovascular myogenic tone. *Am J Physiol – Hear Circ Physiol* 299: 1034–1044.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00214.2010>

97. Štulcová B (1977) Postnatal Development of Cardiac Output Distribution Measured by Radioactive Microspheres in Rats. *Neonatology* 32: 119–124.
<https://doi.org/10.1159/000241004>
98. Jankov RP, Negus A, Keith TA (2001) Antioxidants as therapy in the newborn: Some words of caution. *Pediatr Res* 50: 681–687.
<https://doi.org/10.1203/00006450-200112000-00009>
99. Lee JW, Davis JM (2011) Future applications of antioxidants in premature infants. *Curr Opin Pediatr* 23: 161–166.
<https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3283423e51>

The Role of Reactive Oxygen Species in the Regulation of Blood Vessel Tone in Perinatal and Early Postnatal Ontogenesis

A. A. Shvetsova^{a, *}, D. K. Gaynullina^a, and O. S. Tarasova^{a, b}

^a*Department of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*Institute of Medical and Biological Problems RAS, Moscow, Russia*

**e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com*

Reactive oxygen species (ROS) have been considered for many years as negative regulators in the cardiovascular system. Indeed, excessive production of ROS characterizes many cardiovascular diseases. The damaging effect of ROS can be especially pronounced in a newborn organism, since during this period their contractile effect in pulmonary arteries remains as high as in the pre-term fetus arteries and the antioxidant systems have not yet formed. Therefore, in the first hours and days of independent life, pulmonary arteries tend to contract, primarily due to the low bioavailability of endothelial NO, which increases the risk of developing pulmonary hypertension in newborns. At the same time, during the perinatal period, ROS play an important role in the adaptive reactions of the circulatory system. ROS provide occlusion of the ductus arteriosus and separation of the pulmonary and systemic circulations soon after birth, and also contribute to the contraction of peripheral vessels during hypoxia, which often accompanies the delivery, and therefore provide priority blood supply to the brain in these conditions. The vasomotor effect of ROS is also pronounced in early postnatal ontogenesis, but it has a different character. In the first weeks of life, the action of ROS serves as one of the mechanisms for increasing endothelium-dependent relaxation of pulmonary vessels. In addition, during early postnatal ontogeny, ROS may play an important role in the regulation of systemic vascular tone. This review outlines the current understanding of the vasomotor role of ROS in the vessels of the pulmonary and systemic circulation and considers the mechanisms of ROS effects on the functioning of vascular endothelial and smooth muscle cells in the perinatal and early postnatal periods.

Keywords: reactive oxygen species (ROS), early postnatal ontogenesis, perinatal period, vascular tone, endothelium, smooth muscle

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

СВОБОДНЫЙ ХОЛИН КРОВИ КАК БИОМАРКЕР
ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА

© 2023 г. Е. И. Савельева^{1, *}, М. А. Ленинский¹, Н. В. Гончаров^{1, 2}

¹НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека,
Ленинградская обл., г.п. Кузьмолковский, Россия

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

*E-mail: saveleva@gpeh.ru

Поступила в редакцию 12.09.2023 г.

После доработки 11.10.2023 г.

Принята к публикации 16.10.2023 г.

Холин является важнейшим нутриентом. С недостаточным потреблением холина связывают митохондриальные дисфункции, оксидативный стресс и обусловленные этими процессами риски развития неалкогольной жировой болезни печени, сердечно-сосудистой патологии, мышечной дистрофии, патологии развития нервной трубки плода. При этом избыточное потребление холина связывают с накоплением в крови уремического токсина — триметиламинооксида, биопреdecessором которого является не фосфатидилхолин, а свободный холин крови. Содержание холина и его метаболитов в плазме крови ассоциировано с разными типами сосудистых патологий, позволяет прогнозировать тяжесть течения сердечно-сосудистых и других ассоциированных с ними заболеваний. Противоречивые сведения о норме и отклонениях от нормы содержания свободного холина в плазме крови в числе прочих факторов обусловлены недостаточным вниманием к стабилизации содержания свободного холина в плазме крови на этапах, предшествующих инструментальному анализу. Использование ЭДТА в качестве антикоагулянта и соблюдение холодового режима (не выше 4°C) сразу же после отбора крови и до инструментального анализа позволяет избежать роста концентрации холина в плазме *ex vivo*.

Ключевые слова: свободный холин, плазма крови, стабилизация, биомаркер, риски, высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемное масс-спектрометрическое детектирование

DOI: 10.31857/S0869813923120099, EDN: CHVWDP

ВВЕДЕНИЕ

Холин ((2-гидроксиэтил)триметиламмоний) — витаминоподобное вещество, поступающее в организм с пищей, а также способное быть синтезированным *de novo* [1]. Структурная формула холина представлена на рис. 1.

Список сокращений: АФК — активные формы кислорода; ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием; ВЭЖХ-УФ — высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием; ИМТ — индекс массы тела; ЛПВП — липопротеины высокой плотности; ЛПНП — липопротеины низкой плотности; ТМА — триметиламин; ТМАО — триметиламинооксид; ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота; ЯМР-спектроскопия — спектроскопия ядерного магнитного резонанса; FMO3 — флаavin-содержащая монооксигеназа 3; SAM — S- аденозилметионин.

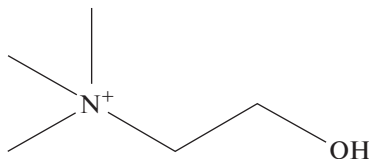


Рис. 1. Структурная формула холина.

Брутто-формула: $C_5H_{14}NO$, молярная масса: 104,1708 г/моль, рег. номер CAS: 62-49-7, рег. номер EINECS: 200-535-1.

Холин вовлечен в реализацию ряда важнейших физиологических функций: является предшественником нейромедиатора ацетилхолина и агонистом альфа-7-никотиновых рецепторов; необходим для укрепления клеточных мембран; является донором метильных групп для синтеза S-аденозилметионина (SAM). Полагают, что холин и фолат, взаимодействуя с витамином B12, действуют как доноры метила для гомоцистеина с образованием метионина, который затем превращается в SAM, являющийся субстратом почти для всех реакций метилирования у млекопитающих [2]. Рекомендуемые нормы потребления холина различны для разных категорий населения и колеблются в интервале от 120 мг/сут для младенцев до 520 мг/сут для кормящих матерей [3]. В литературе описаны риски, обусловленные как недостаточным, так и избыточным потреблением холина.

Риски, связанные с недостаточным потреблением холина

Симптоматический дефицит холина встречается редко. Большинство людей получают достаточное количество холина из рациона питания и способны к его биосинтезу [4]. Симптоматический дефицит, как правило, обусловлен определенными заболеваниями или другими косвенными причинами [5]. При дефиците холина снижается доступность фосфатидилхолинов и транспорт жирных кислот из печени, что приводит к накоплению жира в печени [6]. Тяжелый дефицит вызывает повреждение мышц и неалкогольную жировую болезнь печени, которая может перерасти в цирроз [6]. Были предложены и другие одновременно действующие механизмы, объясняющие наблюдаемое повреждение печени. Например, недостаток фосфатидилхолинов приводит к неспособности митохондриальных мембран поддерживать надлежащий электрохимический градиент, который, помимо прочего, необходим для β -окисления жирных кислот. Как результат, снижается скорость метаболизма жиров в печени [7]. Как полагают некоторые исследователи [8], именно митохондриальные дисфункции и оксидативный стресс являются причинами развития неалкогольного жирового гепатоза при дефиците холина и метионина в рационе.

Поскольку дефицит холина снижает выработку SAM, который участвует в метилировании ДНК, это может способствовать канцерогенезу и развитию онкологических заболеваний, также обсуждается связь дефицита холина с сердечно-сосудистыми заболеваниями [9]. Однако обсервационные исследования свободных популяций не показали убедительной связи между низким потреблением холина и сердечно-сосудистыми заболеваниями или большинством видов рака. Исследования связи риска рака простаты с недостаточным потреблением холина дали противоречивые результаты [10, 11]. В то же время общепризнанные рекомендации по повышенному потреблению холина в периоды беременности и грудного вскармливания обусловлены консенсусной позицией относительно рисков его дефицита в эти периоды. Добавка холина является важной стратегией питания беременных женщин для улучшения здоровья плода [12]. Определенные мутации, нарушающие

Таблица 1. Механизмы развития некоторых патологий, обусловленных дефицитом холина

Этиология	Ключевой механизм	Ссылка
Сердечно-сосудистая патология в сочетании с неалкогольной жировой болезнью печени	Нарушения липидного обмена	[16]
Неалкогольная жировая болезнь печени	Дисрегуляция активации макрофагов	[17]
	Оксидативный стресс	[18]
	Митохондриальный оксидативный стресс	[19]
	Митохондриальные дисфункции	[20]
	Оксидативный стресс, повреждение ДНК	[21]
	Нарушение липидного обмена	[22]
	Эпигенетика	[23]
Воспаление и фиброз печени	Снижение эффективности фосфорилирования	[24]
Мышечная дистрофия	Дефицит метильных групп, нарушение синтеза белков	[25]

метаболизм холина, или низкое потребление холина матерью обуславливают повышенный риск дефектов нервной трубки плода, тогда как повышенное потребление холина матерью связывают с лучшим нейрокognитивным развитием у детей [13]. Отмечается, что дефицит холина может быть обусловлен не столько его пониженным содержанием в рационе, сколько низкой биодоступностью. Недостаточное усвоение холина тесно связано с жировыми заболеваниями печени, мышечной дисфункцией [14] и женскими репродуктивными заболеваниями, в частности, концентрация циркулирующего холина снижена у пациенток с синдромом поликистозных яичников [15].

В табл. 1 суммированы некоторые источники, в которых высказываются предположения о ключевом механизме развития патологий, обусловленных дефицитом холина.

Нарушение липидного обмена, характерное для развития неалкогольной жировой болезни печени, может быть конкретизировано как повышение печеночного липогенеза *de novo* с преобладанием липопротеинов высокой плотности [26].

Недавно были опубликованы результаты системного исследования влияния дефицита холина на основные регуляторные системы организма [27]. Трансгенные 3xTg-AD и нетрансгенные мыши в течение 9 месяцев получали обогащенную холином (2 г/кг холина битартрата), либо бесхолиновую лабораторную диету. Отметим, что тройная трансгенная мышинная модель AD (3xTg-AD) — единственная модель, в которой наблюдаются оба вида патологий, характерных для человека при болезни Альцгеймера — патология бляшек и патология клубочков. Для этой широко используемой модели характерны три мутации, ассоциированные с болезнью Альцгеймера. Бесхолиновая диета сопровождалась понижением содержания холина в плазме крови, увеличением веса, ухудшением двигательных функций и метаболизма глюкозы, причем у трансгенных мышей эти эффекты были выражены заметнее. Анализ тканей показал наличие патологии сердца и печени, повышенное содержание растворимого и нерастворимого амилоида- β , а также гиперфосфорилированного тау-белка на различных патологических эпитопах в гиппокампе и коре головного мозга трансгенных мышей. Протеомный анализ образцов гиппокампа и плазмы крови показал изменение протеома гиппокампа, связанного с регуляцией функций микротрубочек и постсинаптической мембраны. В плазме крови дефицит

холина затрагивал протеом, связанный с уровнем инсулина, функцией митохондрий, воспалительными процессами и метаболизмом фруктозы. Полученные данные свидетельствуют о том, что нормальное потребление холина необходимо как для предотвращения общесистемной органной патологии, так и для снижения тяжести течения болезни Альцгеймера.

Таким образом, достаточное поступление холина важно для поддержания здоровья человека и животных, но в целом роль дефицита холина в рационе питания до настоящего времени не получила исчерпывающей трактовки.

Позитивные метаболические эффекты холина

Холин играет важную роль во многих физиологических процессах, включая физические нагрузки, которые оказывают влияние на синтез нейротрансмиттеров (ацетилхолина), сигнальные функции клеточных мембран (фосфолипиды), транспорт липидов (липопротеины) и метаболизм метильных групп (снижение гомоцистеина), увеличивая потребность в холине как метаболическом субстрате. Физические нагрузки способствуют повышению уровня холина в циркулирующей крови, следовательно, можно полагать, что ресурс доступности свободного холина ассоциирован с толерантностью к физическим нагрузкам. При этом отмечается [28], что напряженная и длительная физическая активность приводит к значимому снижению уровня холина в крови, в таких случаях пероральный прием холина может повысить выносливость. В работе [29] отмечен антиоксидантный эффект холина у пациентов с метаболическим синдромом. Добавка холина к рациону котов, страдающих избыточным весом, оказала благоприятный эффект на состояние печени и повышение доли мышечной массы [30]. Добавка холина в рацион поросят регулирует разнообразие микробиома, активность эпителия кишечника и экспрессию генов цитокинов [31]; авторы исследования предполагают наличие сложных перекрестных связей между уровнем потребления холина, кишечным микробиомом, функцией эпителия и врожденным иммунным ответом, что, в свою очередь, активизирует развитие фолликулов в яичниках. Пожизненное потребление высоких доз холина (5.0 г/кг холинхлорида по сравнению с 1.1 г/кг в группе контрольного питания) значительно снижает риск развития болезни Альцгеймера и связанные с ней когнитивные нарушения [32].

Негативные эффекты избыточного потребления холина

Избыток холина в пище может привести к тромбозу [33], сердечно-сосудистым заболеваниям [34], инсульту [35]. Негативные эффекты избыточного потребления холина связывают с его преобразованием микробиомом кишечника в триметиламин (ТМА), который всасывается в кровь и впоследствии окисляется печеночными ферментами с образованием триметиламин-N-оксида (ТМАО), способствующий патогенезу вышеуказанных заболеваний через гиперактивацию тромбоцитов, усилению образования пенных клеток и индукцию воспалительных реакций [36]. Пенными и менее подвижными макрофаги становятся из-за избытка липидов, они начинают выделять воспалительные сигналы и в итоге гибнут. Повышенная биодоступность холина обусловлена составом кишечного микробиома, в частности, бактериями, продуцирующими ТМА [37]. В то же время рацион с высоким содержанием холина и жиров изменяет состав микроорганизмов кишечника, вырабатывающих ТМА, что, как полагают, опосредовано изменением митохондриальной функции эпителия толстой кишки [38]. Эти данные позволяют предположить, что существует тесное взаимодействие между потреблением холина, микробиомом и функцией кишечника, это приводит к различным режимам активации катаболических путей. В доклинических исследованиях установлено, что повышенное по-

требление холина приводит к эндотелиальной дисфункции и окислительному повреждению печени [39].

Помимо установления норм потребления холина необходимы соответствующие методы для оценки статуса холина в популяции путем измерения содержания холина и связанных с ним метаболитов в циркулирующей крови.

Содержание свободного холина в плазме крови как показатель физиологического статуса организма

В работе [40] была исследована связь между содержанием холина, бетаина, карнитина и диметилглицина в плазме крови и уровнем кардиометаболических биомаркеров. Показано, что циркулирующие холин, карнитин и диметилглицин связаны с неблагоприятным профилем кардиометаболического риска, в то время как циркулирующий бетаин — напротив, с благоприятным. Несмотря на значительный объем выборки (почти 33 тысячи добровольцев), данные были взяты из 17 различных исследований, так что подходы к аналитическим измерениям не были унифицированы.

В ряде работ отмечается, что состав питания не оказывает определяющего влияния на уровень циркулирующего холина [41]. Это можно объяснить как достаточно низкой абсорбцией холина, так и его активным потреблением тканями. При достаточно длительном голодании (более недели) уровень холина в плазме снижается не более чем на 50% [42]. Стабилизация уровня холина в плазме может осуществляться за счет гидролиза мембранных фосфолипидов и/или за счет биосинтеза [43]. Но даже в случае курсового приема высоких доз холина (3 нед. в дозе 504 мг/кг) его концентрация в сыворотке значимо не повышалась. Авторы исследования [30] объясняют этот факт быстрым и необратимым превращением холина в бетаин и далее делают вывод о том, что содержание холина в циркулирующей крови не отражает дозу его потребления. Поступление холина в организм из внешних источников предлагается оценивать по уровню бетаина в сыворотке или плазме. Влияние голодания и приема пищи на концентрацию холина в плазме исследовано в работе Wiedeman и соавт. [44]. У 40 здоровых добровольцев (мужчин 21, женщин 19, средний возраст 33 года) образцы крови были взяты утром натощак трижды с разницей в 12 дней. У подгруппы из 19 человек (8 мужчин и 11 женщин) был взят один дополнительный образец после завтрака. Средние значения концентрации свободного холина в плазме ($\pm SD$) при голодании и после приема пищи составили 6.9 ± 1.7 и 8.3 ± 2.4 мкмоль/л соответственно. В общем случае влияние пищевого потребления холина расценивается как менее значимое в сравнении с метаболическими нарушениями, обусловленными негативными физиологическими процессами.

В работе Gossell-Williams и соавт. [45] средний уровень холина в плазме женщин фертильного возраста оценивается как 10 мкмоль/л, пониженный — 8 мкмоль/л, у беременных женщин установлено более высокое содержание холина в плазме — 14 мкмоль/л. Базовый уровень холина в плазме по данным Holm и соавт. [46] у здоровых добровольцев мужчин (средний возраст 43 года) составил 9.6 мкмоль/л. При этом подтверждается отсутствие не только гендерной, но и возрастной зависимости для содержания холина в плазме. Для пожилых людей среднего возраста 82 года (73–89) размах концентраций холина в плазме мужчин составил 6.7–16.4 мкмоль/л ($n = 11$) при медианном значении 12.0, у женщин ($n = 50$) 6.7–14.8 мкмоль/л при медианном значении 11.1 мкмоль/л. При обработке всей выборки без учета гендерной принадлежности ($n = 61$) медианное значение составило 11.3 мкмоль/л. Если базовые уровни содержания холина в плазме не проявляют гендерной зависимости, то трактовка этого содержания в качестве биомаркера, ассоциированного с определенным физиологическим статусом организма, может быть зависимой от

пола. Так, авторы работы [47] установили, что более высокий уровень холина в плазме положительно связан с массой тела и жировой массой, причем эти ассоциации зависят от пола. Считается, что связь уровней триметиламин N-оксида, холина и бетаина с антропометрическими показателями предполагает модулирующее влияние как генетики, так и диеты.

Таким образом, содержание холина в плазме крови, отобранной натощак, может рассматриваться как маркер физиологического статуса организма.

Содержание холина в плазме как показатель риска патологических процессов

Известно, что холин вовлечен в метаболические процессы, связанные с рядом патологических состояний организма [48] и, следовательно, может рассматриваться как биомаркер, уровни которого в диагностических средах могут быть ассоциированы с риском здоровья. Активно исследуются риски, ассоциированные с пониженным содержанием холина в плазме. По данным IOM (Institute of Medicine, США), уровень свободного холина в плазме человека составляет 7–20 мкмоль/л, при этом позиция относительно оптимального уровня остается неоднозначной [49]. Источник [46] сообщает о норме для взрослых людей натощак 7.0–9.3 мкмоль/л. Пониженный уровень холина в плазме может быть ассоциирован с болезнью Альцгеймера и воспалительными процессами [50], а также с резистентностью к инсулину через активацию глюкагона [51] и опасностью развития диабета 2-го типа у пациентов с атеросклерозом [52]. Авторы работы [53] характеризуют холин как один из биомаркеров острого коронарного синдрома, который наряду с тропонинами, натрийуретическими пептидами и маркерами воспаления может служить ранним предиктором сердечно-сосудистых рисков. Уровень холина в сыворотке крови позволяет различить подгруппы высокого и низкого риска инфаркта миокарда у тропонин-положительных пациентов [53]. Холин рассматривается как маркер-кандидат для установления ишемической или неишемической этиологии повышения тропонина. В цитируемом обзоре Danne и Möckel суммированы факторы, связанные с пониженным содержанием холина в плазме, сыворотке и/или клетках крови: хирургические операции, черепно-мозговые травмы, цирроз печени, целиакия, длительное парентеральное питание, длительные изнуряющие физические нагрузки, редкие заболевания (гиперметионемия, синдром Туретта). Патологические состояния, связанные с высокими или возрастающими концентрациями холина в плазме, сыворотке и/или клетках крови: острый коронарный синдром (нестабильная стенокардия и острый инфаркт миокарда), инсульт или церебральная ишемия с каротидными бляшками, болезни почек в терминальной стадии, хронический миелогенный лейкоз, беременность [53].

В доклинических исследованиях показано [54], что при пищевом дефиците холина его содержание в плазме крови животных, получавших витамины группы В, было на 10% выше по сравнению с животными, не получавшими витаминов. Можно предположить, что когнитивные дисфункции, обусловленные дефицитом витаминов группы В, связаны в том числе с пониженным уровнем холина в системном кровотоке. Имеется подтверждение этому предположению: у пожилых людей пониженный уровень холина в плазме соответствует более низким когнитивным способностям [55]. Кроме того, установлено положительное влияние холина на прочность костной ткани у людей среднего возраста [56]. Наконец, повышенный уровень холина в сыворотке ассоциирован с благоприятным прогнозом при химиотерапии [57], а содержание холина в плазме является одним из маркеров колоректального рака [58].

Представляют интерес результаты определения свободного холина и транскрипционного фактора Nrf2 в плазме и клетках крови пациентов с хроническими болезнями почек, находящихся на гемодиализе [59]. Транскрипционный фактор Nrf2

обеспечивает антиоксидантный ответ, защищающий клетки при избытке активных форм кислорода (АФК). Уровень холина в плазме крови измеряли методом ВЭЖХ-МС/МС, экспрессию мРНК Nrf2 определяли в изолированных мононуклеарных клетках периферической крови с помощью rt-PCR. Исследования показали, что холин активизирует экспрессию транскрипционного фактора Nrf2.

В работе Schartum-Hansen и соавт. [60] изучена связь содержания холина и его метаболита бетаина в плазме крови с долгосрочным риском развития острого инфаркта миокарда и смертности от всех причин, с учетом статуса курения пациентов со стенокардией. Образцы были получены от 2568 пациентов перед ангиографическим исследованием. Концентрации в плазме холина, но не бетаина, были ниже у курильщиков, при этом холин был положительно связан с С-реактивным белком и тропонином Т у некурящих. Плазменный холин значительно улучшил дискриминацию и реклассификацию при добавлении к установленным факторам сердечно-сосудистого риска, в то время как бетаин плазмы не был связан ни с одной из конечных точек. Повышенное содержание холина в плазме авторы работы [61] рассматривают как индикатор кардиоваскулярного риска, а авторы [62] связывают повышенный риск рака легких с высоким потреблением холина. Во всех случаях холин в плазме как маркер риска достоверно проявляется у некурящих, в то время как для курильщиков достоверная связь отсутствует.

В популяционном исследовании Konstantinov и соавт. [63] в выборке, включающей 7074 мужчин и женщин в возрасте 47–49 и 71–74 лет, изучена связь холина и бетаина в плазме с рядом социально-физиологических и биохимических факторов (курение, физическая активность, индекс массы тела (ИМТ), процент жира в организме, окружность талии, артериальное давление, липиды сыворотки крови, глюкоза). Установлено, что уровень холина и бетаина ниже у женщин, чем у мужчин, и у молодых людей по сравнению с пожилыми. Многомерный анализ показал, что холин положительно коррелирует с триглицеридами, глюкозой, ИМТ, процентом жира, окружностью талии, физической активностью и обратно коррелирует с холестерином ЛПВП и курением. Бетаин был обратно связан с уровнем “плохого” холестерина — ЛПНП, триглицеридов, ИМТ, процентом жира и окружностью талии, систолическим и диастолическим артериальным давлением и курением, но положительно связан с уровнем холестерина ЛПВП и физической активностью. Следовательно, неблагоприятный профиль факторов сердечно-сосудистого риска коррелирует с высокими концентрациями холина и низкими концентрациями бетаина. Тот факт, что холин и бетаин противоположным образом коррелируют с ключевыми компонентами метаболического синдрома, свидетельствует, по мнению авторов, об изменении активности холиндегидрогеназы в митохондриях, что, в свою очередь, может быть связано с изменением митофагии в результате перераспределения этого фермента между наружной и внутренней мембранами митохондрий [64].

Повышенный уровень холина в плазме крови ассоциируется с риском смерти от инфаркта миокарда [65]. Это было установлено при наблюдении порядка 4000 пациентов в возрасте 63 ± 11 лет с риском инфаркта миокарда. Авторы исследования считают возможным рассматривать этот показатель независимо от традиционных факторов риска, но отмечают, что значимость повышенного уровня холина в плазме при сопутствующем повышенном уровне ТМАО существенно повышается. В другом масштабном исследовании с участием почти 7000 человек пациенты ежедневно принимали около 300 мг холина [66]. Уровень холина в плазме составил в среднем 9.61 (8.28–11.1) мкмоль/л, причем у пациентов с хронической фибрилляцией предсердий он был несколько выше — 10.2 (8.82–12.1) мкмоль/л, на основании чего был сделан вывод о вовлеченности метаболизма холина в патогенез фибрилляции предсердий.

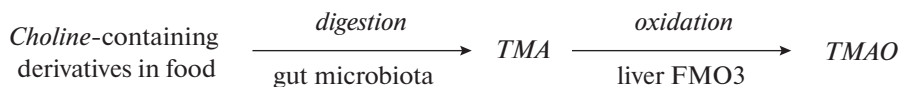


Рис. 2. Схема биотрансформации холина.

Анализируя в совокупности результаты работ Schartum-Hansen и соавт. [60] и Wang и соавт. [65], в которых использован подход, основанный на разделении групп риска на квартили, можно заключить, что уровень холина в плазме, превышающий порог 11–12 мкмоль/л, можно рассматривать как показатель повышенного кардиоваскулярного риска. Ранее было отмечено, что по данным [45] содержание свободного холина в плазме крови женщин в период беременности возрастает и достигает уровня 14 мкмоль/л. Значит ли это, что беременные женщины попадают в зону кардиоваскулярного риска? Это так, но лишь отчасти. Беременность способствует обострению кардиоваскулярного и других рисков, если они имелись ранее. В то же время даже в отсутствие рисков повышенное содержание холина в плазме беременных женщин свидетельствует о мобилизации организма к преодолению нагрузки. Повышенное содержание холина в плазме людей, подвергающихся экстремальным нагрузкам или переживающих период реабилитации после травм и операций [53], также, как мы полагаем, указывает на мобилизацию резервных возможностей организма. Вызовом к мобилизации может стать как повышенная нагрузка в отсутствие патологии, так и развивающееся заболевание.

В исследовании [67] было показано, что содержание холина и его метаболитов в плазме ассоциировано с разными типами сосудистых патологий, что позволяет предположить различную роль холина и его метаболитов в патогенезе сердечно-сосудистых и церебральных заболеваний с вовлечением крупных и мелких сосудов. Некоторые исследователи сердечно-сосудистые заболевания, нарушение функции почек, диабет 2-го типа ассоциируют с уровнем ТМАО в плазме крови [68]. При этом установлено, что не фосфатидилхолин, а именно свободный холин является субстратом для кишечной микробиоты и биопредшественником уремических токсинов – ТМА и ТМАО [69]. Зафиксированы значительные различия в кинетике превращения холина в ТМАО у разных людей. В связи с этим можно предположить, что индивидуальные рекомендации по коррекции кишечного микробиома могут быть сделаны на основании оценки такого показателя, как соотношение концентраций свободного холина и ТМАО в плазме крови. В упрощенном виде схема биотрансформации холина в ТМА и ТМАО представлена на рис. 2. Окисление ТМА происходит с участием печеночного фермента флавин-содержащей монооксигеназы 3 (FMO3), образующейся преимущественно в печени. Нарушение функции этого фермента приводит к триметиламинурии. Молекулярно-генетическая причина триметиламинурии заключается в мутации гена, который кодирует FMO3.

Таким образом, холин является достаточно важным диагностическим биомаркером при оценке риска сердечно-сосудистых и некоторых других заболеваний, в связи с этим процедуры определения холина в плазме или сыворотке крови представлены во многих публикациях. Следует отметить, что трудности в исполнении соответствующих методик отмечаются в более поздних работах. Возможно, это связано с ужесточением требований к валидации биоаналитических методик в последнее время. Диагностическая ценность биомаркера определяется наличием достоверной информации о его базовых концентрациях в исследуемых биоматрицах, допустимых вариациях базовых концентраций, соответствующих норме, и, не в

последнюю очередь, доступностью валидированных аналитических методик, позволяющих получать совпадающие результаты в разных лабораториях.

Аналитические аспекты

В качестве инструментальных методов при определении холина в пищевых продуктах и биопробах применяются биосенсоры различных типов [70], газовая хроматография [71], капиллярный зонный электрофорез [72], ионная хроматография [73], электрохимические методы [74], ЯМР-спектроскопия [75]. Поскольку холин относится к группе четвертичных аммониевых оснований, которые не способны к образованию летучих производных, использование метода газовой хроматографии даже с предколоночной дериватизацией затруднено. Холин практически не поглощает свет в ультрафиолетовой области спектра, что затрудняет применение ВЭЖХ-УФ. Методом выбора для определения концентраций холина в плазме остается высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Подавляющее большинство исследований, включающих определение свободного холина в плазме, выполнено методом ВЭЖХ-МС/МС [46, 76 и др.]. При очевидных преимуществах метода ВЭЖХ-МС/МС ограничением к его применению является трудность достижения линейной градуировочной характеристики в биологически обусловленном диапазоне концентраций.

В работе [77] отмечается нелинейность калибровки определения холина методом ВЭЖХ-МС/МС. В цитируемой работе представлены калибровочные кривые, полученные при разработке методики определения четырех метаболически связанных биогенных компонентов плазмы: карнитина, бетаина, ТМАО и холина. Именно для холина калибровочная зависимость была в наибольшей степени нелинейна, поэтому важной задачей при оптимизации методики является достижение линейной градуировочной характеристики. В работе [78] продемонстрировано определение свободного холина в плазме и сыворотке крови методами ВЭЖХ-МС и ЯМР и получены совпадающие результаты. При этом установлено, что в случае приготовления плазмы и сыворотки из одних и тех же образцов крови, содержание холина в сыворотке выше, чем в плазме. Размах концентраций холина в плазме оценен на уровне $<5.9\text{--}13.1$ мкмоль/л, в сыворотке — на уровне $<7.1\text{--}20.0$ мкмоль/л. Интересные данные сравнительного исследования содержания холина в плазме и цельной крови представлены в работе Awwad и соавт. [79]. Цельная кровь перед анализом была гемолизирована. Медиана концентраций холина составила 11.3 мкмоль/л в плазме и 66.6 мкмоль/л в цельной крови соответственно. Наблюдалась положительная корреляция между содержанием холина в цельной крови и плазме ($r = 0.42$, $p \leq 0.001$). Авторы полагают, что концентрации холина в цельной крови отражают его внутриклеточные концентрации, которые, в свою очередь, коррелируют с концентрациями холина в цитозоле. В аналогичных по своим задачам работах [80, 81] авторы не наблюдали значительных различий в содержании холина в цельной крови, стабилизированной ЭДТА или гепарином. При этом в отдельных пробах плазмы, стабилизированных гепарином, стандартное отклонение при определении холина было несколько выше, чем в пробах плазмы, стабилизированных ЭДТА. То обстоятельство, что содержание холина в плазме может быть установлено путем пересчета его концентрации в цельной крови, открывает возможности для малоинвазивного экспресс-тестирования содержания холина в капле крови и, возможно, даже в сухих пятнах крови. В настоящее время подавляющее большинство данных относится к содержанию свободного холина именно в плазме крови, но не в цельной крови или сыворотке.

Возможные причины влияния различных видов пробоподготовки на концентрацию холина в клинических образцах исследованы в работе Ohkawa и соавт. [82].

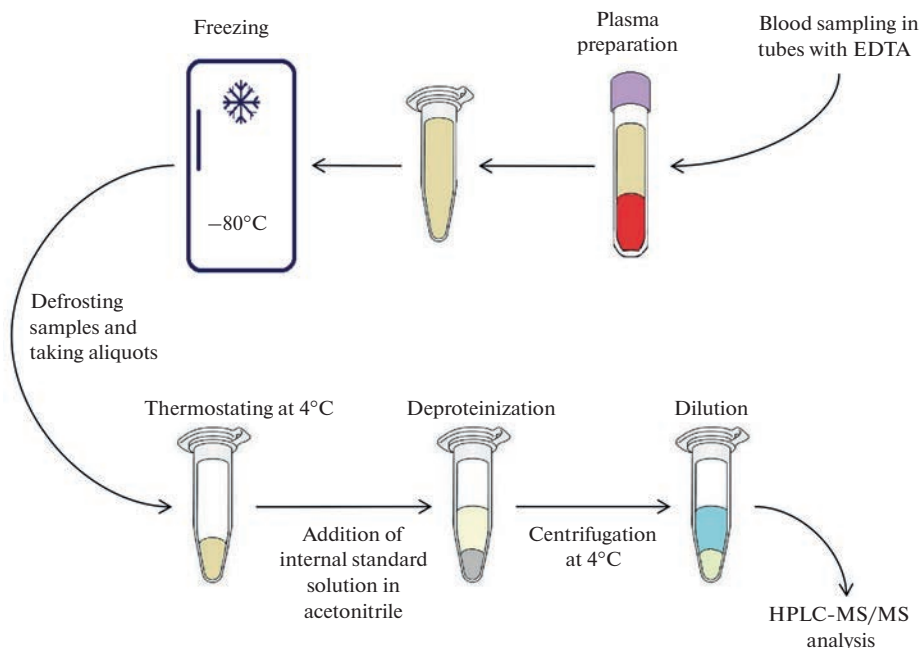


Рис. 3. Подготовка плазмы крови к определению содержания свободного холина методом ВЭЖХ-МС/МС.

В качестве одного из факторов, которые могут влиять на изменение концентрации холина во время пробоподготовки, рассматривается аутоксиназа (ЕС 3.1.4.39). Этот фермент идентичен лизофосфолипазе D, которая превращает лизофосфатидилхолин в биоактивный липидный медиатор лизофосфатидную кислоту и холин [83]. Аналитической проблемой является эндогенная природа холина, который поступает в плазму крови из двух источников: пищевое потребление и синтез *de novo* из фосфатидилхолина [84]. Генетические вариации, обуславливающие разную активность ферментов у разных индивидов, создают значительные трудности в установлении нормы содержания холина в плазме крови на популяционном уровне.

По нашему опыту при определении содержания свободного холина в плазме крови источником ошибок является преаналитический этап (приготовление плазмы крови и условия ее хранения) и последующая подготовка плазмы к инструментальному анализу. Избежать этих ошибок могут помочь некоторые простые рекомендации.

Наиболее эффективным способом подавления активности эстераз, способствующих росту концентрации холина в плазме *ex vivo*, представляется соблюдение холодового режима на всех этапах хранения и подготовки проб. В наших экспериментах была установлена стабильность свободного холина в плазме крови, стабилизированной ЭДТА, без заморозки в течение суток при температуре не выше 4°C. С учетом литературных данных, оптимальной биоматрицей для определения холина является плазма крови, взятой натощак. Плазму необходимо готовить сразу после отбора крови с использованием охлаждаемой центрифуги и хранить при температуре не выше -18°C. Последовательность операций, предшествующих инструментальному анализу, отражает схема на рис. 3. При использовании масс-спектрометрии в качестве аналитического метода идеальным внутренним стандартом является изотопно-меченый аналог определяемого вещества. Поскольку приобретение или синтез

изотопно-меченых стандартов доступны не для всех лабораторий, допускается в качестве внутреннего стандарта использовать заведомо экзогенное вещество, близкое аналиту по структуре и физико-химическим свойствам. Авторы [46] при разработке методики определения холина совместно с бетаином в плазме крови в качестве внутреннего стандарта использовали метформин. Мы в качестве внутреннего стандарта использовали более близкий по структуре к холину мельдоний. Схема подготовки плазмы крови к анализу представлена на рис. 3. Внутренний стандарт (мельдоний) вносили в охлажденный (4°C) ацетонитрил, который добавляли в плазму для депотеинизации. Для разбавления плазмы возможно использование деионизированной воды с добавками 0.1% муравьиной кислоты и формиата аммония в концентрации 5 ммоль/л.

Непосредственное проведение ВЭЖХ-МС/МС анализа не рассматривается нами в качестве источника ошибок при определении концентраций свободного холина в плазме. Единственным требованием является использование охлаждаемого автосамплера для подачи проб. Если не удастся обеспечить линейность градуировочной характеристики в области концентраций, превышающих 10 мкмоль/л, проводят разбавление пробы. В этом случае отсутствие влияния разбавления на результат анализа необходимо доказывать в рамках валидационных испытаний. В перспективе переход на определение диагностически значимых биомаркеров, включая холин [85], в сухих пятнах крови позволит отказаться от отбора венозной крови и приготовления плазмы, снимет проблему обеспечения холодового режима на всех этапах подготовки, хранения и транспортировки биопроб. Препятствиями на этом пути остаются нерешенная до настоящего времени проблема правильного учета влияния гематокрита и отсутствие накопленного объема справочных данных о концентрациях биомаркеров в цельной крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для определения содержания свободного холина оптимальной биоматрицей является плазма крови, стабилизированная ЭДТА. Оптимальным методом для определения холина в плазме является ВЭЖХ-МС/МС в случае успешного преодоления проблемы нелинейности градуировочной характеристики при определении высоких концентраций. Норму содержания холина в плазме для здорового человека можно оценивать в пределах 4–12 мкмоль/л, более высокий уровень холина может рассматриваться в качестве дополнительного ресурса при беременности и грудном вскармливании, а также при экстремальных нагрузках. В пожилом возрасте, при болезни Альцгеймера и прочих когнитивных расстройствах, метаболическом синдроме, кардиоваскулярных проблемах и ряде других патологических состояний высокий уровень свободного холина в плазме указывает на риск тяжелого течения и неблагоприятного исхода заболевания.

Прогрессивной стратегией является интерпретация содержания свободного холина в плазме в совокупности с другими показателями, хотя предстоит еще разработать исчерпывающие рекомендации по интерпретации этого биомаркера. Понятно, что интерпретация должна проводиться применительно к конкретным обстоятельствам: предполагаемому или подтвержденному диагнозу, сопутствующим рискам и т.д.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и использований животных в качестве объектов исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №22-15-00155).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Сбор материалов (Е.И.С., Н.В.Г., М.А.Л.), написание и редактирование манускрипта (Е.И.С., Н.В.Г., М.А.Л.), иллюстрации (М.А.Л.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zeisel SH (2000) Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition* 16 (7–8): 669–671. [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(00\)00349-x](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(00)00349-x)
2. Goh YO, Cheam G, Wang Y (2021) Understanding Choline Bioavailability and Utilization: First Step Toward Personalizing Choline Nutrition. *J Agric Food Chem* 69: 10774–10789. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03077>
3. Shim E, Park E (2022) Choline intake and its dietary reference values in Korea and other countries: a review. *Nutr Res Pract* 16: 126–133. <https://doi.org/10.4162/nrp.2022.16.S1.S126>
4. Rucker RB, Zempleni J, Suttie JW, McCormick DB (2007) *Handbook of vitamins* (4th ed). Taylor & Francis 459–477.
5. Plotnikoff GA, Dobberstein L, Raatz S (2023) Nutritional Assessment of the Symptomatic Patient on a Plant-Based Diet: Seven Key Questions. *Nutrients* 15: 1387. <https://doi.org/10.3390/nu15061387>
6. Osipova D, Kokoreva K, Lazebnik L, Golovanova E, Pavlov C, Dukhanin A, Orlova S, Starostin K (2022) Regression of Liver Steatosis Following Phosphatidylcholine Administration: A Review of Molecular and Metabolic Pathways Involved. *Front Pharmacol* 13: 797923. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.797923>
7. Corbin KD, Zeisel SH (2012) Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression". *Current Opinion Gastroenterol* 28(2): 159–165. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834e7b4b>
8. Chen X, Xue H, Fang W, Chen K, Chen S, Yang W, Shen, T, Chen X, Zhang P, Ling W (2019) Adropin protects against liver injury in nonalcoholic steatohepatitis via the Nrf 2 mediated antioxidant capacity. *Redox Biol* 21: 101068. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2018.101068>
9. Dietary reference values for choline (2016) *EFSA J* 14(8). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.44842016>
10. Richman EL, Kenfield SA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Zeisel SH, Willett WC, Chan JM (2012) Choline intake and risk of lethal prostate cancer: incidence and survival. *Am J Clin Nutr* 96 (4): 855–863. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.039784>
11. Han P, Bidulescu A, Barber JR, Zeisel SH, Joshi CE, Prizment AE, Vitolins MZ, Platz EA (2019) Dietary choline and betaine intakes and risk of total and lethal prostate cancer in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Cancer Causes Control* 30(4): 343–354. <https://doi.org/10.1007/s10552-019-01148-4>
12. Zeisel SH (2006) Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu Rev Nutr* 26: 229–250. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.26.061505.11>
13. Obeid R, Derbyshire E, Schön C (2022) Association between Maternal Choline, Fetal Brain Development, and Child Neurocognition: Systematic Review and Meta-Analysis of Human Studies. *Advanc Nutr* 13(6): 2445–2457. <https://doi.org/10.1093/advances/nmac082>
14. Buchman AL (2009) The addition of choline to parenteral nutrition. *Gastroenterology* 137: 119–128. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.010>
15. Troisi J, Cinque C, Giugliano L, Symes S, Richards S, Adair D, Cavallo P, Sarno L, Scala G, Caiazza M, Guida M (2019) Metabolomic change due to combined treatment with myo-inositol, D-chiro-inositol and glucomannan in polycystic ovarian syndrome patients: a pilot study. *J Ovar Res* 12(1): 25. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0500-x>

16. *Deprince A, Haas JT, Staels B* (2020) Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease. *Mol Metab* 42: 101092.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101092>
17. *Du X, Wu Z, Xu Y, Liu Y, Liu W, Wang T, Li C, Zhang C, Yi F, Gao L, Liang X, Ma C* (2018) Increased Tim-3 expression alleviates liver injury by regulating macrophage activation in MCD-induced NASH mice. *Cell Mol Immunol* 16(11): 878–886.
<https://doi.org/10.1038/s41423-018-0032-0>
18. *Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H* (2020) Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biol Med* 152: 116–141.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>
19. *García-Ruiz C, Fernández-Checa JC* (2018) Mitochondrial Oxidative Stress and Antioxidants Balance in Fatty Liver Disease. *Hepatol Communicat* 2(12): 1425–1439.
<https://doi.org/10.1002/hep4.1271>
20. *Teodoro JS, Rolo AP, Duarte FV, Simões AM, Palmeira CM* (2008) Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: Understanding fatty liver disease progression. *Mitochondrion* 8(5–6): 367–376.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2008.07.008>
21. *Tanaka S, Miyanishi K, Kobune M, Kawano Y, Hoki T, Kubo T, Hayashi T, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kato J* (2013) Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 48(11): 1249–1258.
<https://doi.org/10.1007/s00535-012-0739-0>
22. *Pei K, Gui T, Kan D, Feng H, Jin Y, Yang Y, Zhang Q, Du Z, Gai Z, Wu J, Li Y* (2020) An Overview of Lipid Metabolism and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *BioMed Res Int* 1–12: 4020249.
<https://doi.org/10.1155/2020/4020249>
23. *Ashraf NU, Altaf M* (2018) Epigenetics: An emerging field in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Mutat Res Rev Mut Res* 778: 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.07.002>
24. *Yoo N, Jeon S, Nam Y, Park Y-J, Won SB, Kwon Y* (2015) Dietary Supplementation of Genistein Alleviates Liver Inflammation and Fibrosis Mediated by a Methionine-Choline-Deficient Diet in db/db Mice. *J Agricult Food Chem* 63(17): 4305–4311.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00398>
25. *Alves FM, Caldow MK, Trieu J, Naim T, Montgomery MK, Watt MJ, Lynch GS, Koopman R* (2019) Choline administration attenuates aspects of the dystrophic pathology in mdx mice. *Clin Nutr Exp* 24: 83–91.
<https://doi.org/10.1016/j.clnex.2018.12.005>
26. *Payne F, Lim K, Girousse A, Brown RJ, Kory N, Robbins A, Xue Y, Sleight A, Cochran E, Adams C, Dev Borman A, Russel-Jones D, Gorden P, Semple RK, Saudek V, O’Rahilly S, Walther TC, Barroso I, Savage DB* (2014) Mutations disrupting the Kennedy phosphatidylcholine pathway in humans with congenital lipodystrophy and fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(24): 8901–8906.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1408523111>
27. *Dave N, Judd J M, Decker A, Winslow W, Sarette P, Villarreal Espinosa O, Tallino S, Bartholomew SK, Bilal A, Sandler J, McDonough I, Winstone J K, Blackwood E A, Glembotski C, Karr T, Velazquez R* (2023) Dietary choline intake is necessary to prevent systems-wide organ pathology and reduce Alzheimer’s disease hallmarks. *Aging Cell* 22: e13775.
<https://doi.org/10.1111/accel.13775>
28. *Penry JT, Manore MM* (2008) Choline: An Important Micronutrient for Maximal Endurance-Exercise Performance? *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 18(2): 191–203.
<https://doi.org/10.1123/ijnsnem.18.2.191>
29. *Dibella M, Thomas MS, Alyousef H, Millar C, Blesso C, Malysheva O* (2020) Choline intake as supplement or as a component of eggs increases plasma choline and reduces interleukin-6 without modifying plasma cholesterol in participants with metabolic syndrome. *Nutrients* 12: 1e.
<https://doi.org/10.3390/nu12103120>
30. *Rankovic A, Godfrey H, Grant CE, Shoveller AK, Bakovic M, Kirby G* (2023) Serum metabolomic analysis of the dose-response effect of dietary choline in overweight male cats fed at maintenance energy requirements. *PLoS One* 18(1): e0280734.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280734>
31. *Zhan X, Fletcher L, Huyben D, Cai H, Dingle S, Qi N, Huber L-A, Wang B, Li J* (2023) Choline supplementation regulates gut microbiome diversity, gut epithelial activity, and the cytokine gene expression in gilts. *Front Nutr* 10: 1101519.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1101519>
32. *Velazquez R, Ferreira E, Knowles S, Fux C, Rodin A, Winslow W, Oddo S* (2019) Lifelong choline supplementation ameliorates Alzheimer’s disease pathology and associated cognitive deficits by attenuating microglia activation. *Aging Cell* 18: e13037.
<https://doi.org/10.1111/accel.13037>

33. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z (2016) Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell* 165: 111–124.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.011>
34. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B (2011) Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472: 57–63.
<https://doi.org/10.1038/nature09922>
35. Zhu W, Romano KA, Li L, Buffa JA, Sangwan N, Prakash P (2021) Gut microbes impact stroke severity via the trimethylamine N-Oxide pathway. *Cell Host Microbe* 29: 1199–1208.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.05.002>
36. Yang S, Li X, Yang F, Zhao R, Pan X, Liang J (2019) Gut microbiota-dependent marker TMAO in promoting cardiovascular disease: inflammation mechanism, clinical prognostic, and potential as a therapeutic target. *Front Pharmacol* 10: 1360.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01360>
37. Romano KA, Vivas EI, Amador-Noguez D, Rey FE (2015) Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite Trimethylamine-N-Oxide. *mBio* 6: e02481-14.
<https://doi.org/10.1128/mBio.02481-14>
38. Yoo W, Zieba JK, Foegeding NJ, Torres TP, Shelton CD, Shealy NG (2021) High-Fat Diet–Induced colonocyte dysfunction escalates microbiota-derived trimethylamine N-oxide. *Science* 373: 813–818.
<https://doi.org/10.1126/science.aba3683>
39. Ren D, Liu Y, Zhao Y, Yang X (2016) Hepatotoxicity and endothelial dysfunction induced by high choline diet and the protective effects of phloretin in mice. *Food Chem Toxicol* 94: 203–212.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.004>
40. Pan XF, Yang JJ, Shu XO, Moore SC, Palmer ND, Guasch-Ferré M, Herrington DM, Harada S, Eliassen H, Wang TJ, Gerszten RE, Albanes D, Tzoulaki I, Karaman I, Elliott P, Zhu H, Wagenknecht LE, Zheng W, Cai H, Cai Q, Matthews CE, Menni C, Meyer KA, Lipworth LP, Ose J, Forrester M, Ulrich CM, Yu D (2021) Associations of circulating choline and its related metabolites with cardiometabolic biomarkers: an international pooled analysis. *Am J Clin Nutr* 114(3): 893–906.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab152>
41. Mujica M, Lewis E, Jacobs R, Letourneau N, Bell R, Field C, Lamers Y (2020) Plasma Free Choline Concentration Did Not Reflect Dietary Choline Intake in Early and Late Pregnancy: Findings from the APrON Study. *Curr Dev Nutr* 4(Suppl 2): 1825.
https://doi.org/10.1093/cdn/nzaa067_052
42. Zeisel SH (2010) Choline. In: Coates PM, Betz JM, Blackman MR (eds). *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2nd ed. London and New York. Informa Healthcare 136–143.
43. Finglas PM (2000) Dietary Reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. *Trends Food Sci Technol* 11(8): 296–297.
[https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(01\)00010-3](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(01)00010-3)
44. Wiedeman AM, Dyer RA, Green TJ, Xu Z, Barr SI, Innis SM, Kitts DD (2018) Variations in plasma choline and metabolite concentrations in healthy adults. *Clin Biochem* 60: 77–83.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.08.002>
45. Gossell-Williams M, Fletcher H, McFarlane-Anderson N, Jacob A, Patel J, Zeisel S (2005) Dietary intake of choline and plasma choline concentrations in pregnant women in Jamaica. *West Indian Med J* 54(6): 355–359.
<https://doi.org/10.1590/s0043-31442005000600002>
46. Holm PI, Ueland PM, Kvalheim G, Lien EA (2003) Determination of choline, betaine, and dimethylglycine in plasma by a high-throughput method based on normal-phase chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 49: 286–294.
<https://doi.org/10.1373/49.2.286>
47. Młodzik-Czyżewska MA, Malinowska AM, Szwengiel A, Chmurzynska A (2002) Associations of plasma betaine, plasma choline, choline intake, and MTHFR polymorphism (rs1801133) with anthropometric parameters of healthy adults are sex-dependent. *J Hum Nutr Diet* 35: 701–712.
<https://doi.org/10.1111/jhn.13046>
48. Arias N, Arbolea S, Allison J, Kaliszewska A, Higarza SG, Gueimonde M, Arias JL (2020) The Relationship between Choline Bioavailability from Diet, Intestinal Microbiota Composition, and Its Modulation of Human Diseases. *Nutrients* 12 (8): 2340.
<https://doi.org/10.3390/nu12082340>
49. Choline – dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline – NCBI bookshelf n.d.
50. Siddiqui A, Shah Z, Jahan RN, Othman I, Kumari Y (2021) Mechanistic role of boswellic acids in Alzheimer's disease: emphasis on anti-inflammatory properties. *Biomed Pharmacother* 144: 112250.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112250>
51. Wu G, Zhang L, Li T, Zuniga A, Lopaschuk GD, Li L, Jacobs RL, Vance DE (2013) Choline supplementation promotes hepatic insulin resistance in phosphatidylethanolamine N-methyl-

- transferase-deficient mice via increased glucagon action. *J Biol Chem* 288(2): 837–847.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.415117>
52. *Dibaba DT, Johnson KC, Kucharska-Newton AM, Meyer K, Zeisel SH, Bidulescu A* (2020) The Association of Dietary Choline and Betaine with the Risk of Type 2 Diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes Care* 43(11): 2840–2846.
<https://doi.org/10.2337/dc20-0733>
53. *Danne O, Möckel M* (2010) Choline in acute coronary syndrome: an emerging biomarker with implications for the integrated assessment of plaque vulnerability. *Expert Rev Mol Diagnost* 10(2): 159–171.
<https://doi.org/10.1586/erm.10.2>
54. *Van Wijk N, Watkins C, Böhlke M, Maher T, Hageman R, Kamphuis P, Wurtman R* (2012) Plasma choline concentration varies with different dietary levels of vitamins B6, B12 and folic acid in rats maintained on choline-adequate diets. *Br J Nutr* 107(10): 1408–1412.
<https://doi.org/10.1017/S0007114511004570>
55. *Nurk E, Refsum H, Bjelland I, Drevon CA, Tell GS, Ueland PM, Vollset SE, Engedal K, Nygaard HA, Smith DA* (2013) Plasma free choline, betaine and cognitive performance: the Hordaland Health Study. *Br J Nutr* 109(3): 511–519.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512001249>
56. *Øyen J, Gjesdal CG, Karlsson T, Svingen GF, Tell GS, Strand E, Drevon CA, Vinknes KJ, Meyer K, Ueland PM, Nygård O* (2017) Dietary Choline Intake Is Directly Associated with Bone Mineral Density in the Hordaland Health Study. *J Nutrition* 147(4): 572–578.
<https://doi.org/10.3945/jn.116.243006>
57. *Watson GA, Sanz-Garcia E, Zhang W-J, Liu ZA, Yang SC, Wang B, Liu S, Kubli S, Berman H, Pfister T, Genta S, Spreafico A, Hansen AR, Bedard PL, Lheureux S, Razak A, Cescon D, Butler MO, Xu W, Chen E* (2022) Increase in serum choline levels predicts for improved progression-free survival (PFS) in patients with advanced cancers receiving pembrolizumab. *J Immunotherapy Cancer* 10(6): e004378
<https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004378>
58. *Li S, Guo B, Song J, Deng X, Cong Y, Li P, Zhao K, Liu L, Xiao G, Xu F, Ye Y, Zhao Z, Yu M, Xu Y, Sang J, Zhang J* (2012) Plasma choline-containing phospholipids: potential biomarkers for colorectal cancer progression. *Metabolomics* 9(1): 202–212.
<https://doi.org/10.1007/s11306-012-0439-z>
59. *Mafra D, Cardozo L, Ribeiro-Alves M, Bergman P, Shiels PG, Stenvinkel P* (2022) Short Report: Choline plasma levels are related to Nrf2 transcriptional expression in chronic kidney disease? *Clin Nutrition ESPEN* 50: 318–321.
<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.06.008>
60. *Schartum-Hansen H, Pedersen ER, Svingen GF, Ueland PM, Seifert R, Ebbing M, Strand E, Bleie Ø, Nygård O* (2014) Plasma choline, smoking, and long-term prognosis in patients with stable angina pectoris. *Eur J Prevent Cardiol* 22(5): 606–614.
<https://doi.org/10.1177/2047487314524867>
61. *Garbuzenko DV, Belov DV* (2021) Non-alcoholic fatty liver disease as an independent factor of cardiometabolic risk of cardiovascular diseases. *Exp Clin Gastroenterol* 10: 22–34.
<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-194-10-22-34>
62. *Ying J, Rahbar MH, Hallman DM, Hernandez LM, Spitz MR, Forman MR, Gorlova OY* (2013) Associations between Dietary Intake of Choline and Betaine and Lung Cancer Risk. *PLoS One* 8(2): e54561.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054561>
63. *Konstantinova SV, Tell GS, Vollset SE, Nygård O, Bleie Ø, Ueland PM* (2008) Divergent associations of plasma choline and betaine with components of metabolic syndrome in middle age and elderly men and women. *J Nutr* 138(5): 914–920.
<https://doi.org/10.1093/jn/138.5.914>
64. *Park S, Choi SG, Yoo SM, Son JH, Jung YK* (2014) Choline dehydrogenase interacts with SQSTM1/p62 to recruit LC3 and stimulate mitophagy. *Autophagy* 10(11): 1906–1920.
<https://doi.org/10.4161/auto.32177>
65. *Wang, Z, Tang WHW, Buffa JA, Fu X, Britt EB, Koeth RA, Levison BS, Fan Y, Wu Y, Hazen SL* (2014) Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J* 35(14): 904–910.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu002>
66. *Zuo H, Svingen GFT, Tell GS, Ueland PM, Vollset SE, Pedersen ER, Ulvik A, Meyer K, Nordrehaug JE, Nilsen DWT, Bonaa KH, Nygård O* (2018) Plasma Concentrations and Dietary Intakes of Choline and Betaine in Association with Atrial Fibrillation Risk: Results From 3 Prospective Cohorts with Different Health Profiles. *J Am Heart Assoc* 7(8): e008190.
<https://doi.org/10.1161/jaha.117.008190>
67. *Roe AJ, Zhang S, Bhadelia RA, Johnson EJ, Lichtenstein AH, Rogers GT, Rosenberg IH, Smith CE, Zeisel SH, Scott TM* (2017) Choline and its metabolites are differently associated with cardiometabolic risk factors, history of cardiovascular disease, and MRI-documented cerebrovas-

- cular disease in older adults. *Am J Clin Nutr* 105(6): 1283–1290.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.116.137158>
68. *Gessner A, di Giuseppe R, Koch M, Fromm MF, Lieb W, Maas R* (2020) Trimethylamine-N-oxide (TMAO) determined by LC-MS/MS: distribution and correlates in the population-based Pop-Gen cohort. *Clin Chem Labor Med* 58(5): 733–740.
<https://doi.org/10.1515/cclm-2019-1146>
69. *Cho CE, Aardema NDJ, Bunnell ML, Larson DP, Aguilar SS, Bergeson JR, Malysheva OV, Caudill MA, Lefevre M* (2020) Effect of Choline Forms and Gut Microbiota Composition on Trimethylamine-N-Oxide Response in Healthy Men. *Nutrients* 12(8): 2220.
<https://doi.org/10.3390/nu12082220>
70. *Rahimi P, Joseph Y* (2019) Enzyme-based biosensors for choline analysis: A review. *Trends Anal Chem* 110: 367–374.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.035>
71. *Saucerman JR, Winstead CE, Jones TM* (1984) Quantitative Gas Chromatographic Headspace Determination of Choline in Adult and Infant Formula Products. *J Assoc Anal Chem* 67(5): 982–985.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/67.5.982>
72. *Zhang L, Liu Y, Chen G* (2004) Simultaneous determination of allantoin, choline and l-arginine in Rhizoma Dioscoreae by capillary electrophoresis. *J Chromat A* 1043(2): 317–321.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.003>
73. *Lin L, Li R, Wang L, Qiu Y* (2018) Determination of choline, putrescine and cadaverine in boletus by ion chromatography with suppressed conductivity detection. *Chin J Chromat* 36(11): 1189.
<https://doi.org/10.3724/sp.j.1123.2018.06027>
74. *Shadlaghani A, Farzaneh M, Kinser D, Reid RC* (2019) Direct Electrochemical Detection of Glutamate, Acetylcholine, Choline, and Adenosine Using Non-Enzymatic Electrodes. *Sensors* 19(3): 447.
<https://doi.org/10.3390/s19030447>
75. *Garcia E, Shalaurova I, Matyus SP, Wolak-Dinsmore J, Oskardmay DN, Connelly MA* (2022) Quantification of choline in serum and plasma using a clinical nuclear magnetic resonance analyzer. *Clin Chim Acta* 524: 106–112.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.11.031>
76. *Ocque AJ, Stubbs JR, Nolin TD* (2015) Development and validation of a simple UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of trimethylamine N-oxide, choline, and betaine in human plasma and urine. *J Pharm Biomed Anal* 109: 128–135.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.040>
77. *Rox K, Rath S, Pieper DH, Vital M, Brönstrup M* (2021) A simplified LC-MS/MS method for the quantification of the cardiovascular disease (CVD) biomarker trimethylamine-N-oxide (TMAO) and its precursors. *J Pharm Anal* 11(4): 523–528.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.03.007>
78. *Garcia E, Shalaurova I, Matyus SP, Wolak-Dinsmore J, Oskardmay DN, Connelly MA* (2022) Quantification of choline in serum and plasma using a clinical nuclear magnetic resonance analyzer. *Clin Chim Acta* 524: 106–112.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.11.031>
79. *Awwad HM, Kirsch SH, Geise J, Obeid R* (2014) Measurement of concentrations of whole blood levels of choline, betaine, and dimethylglycine and their relations to plasma levels. *J Chromat B* 957: 41–45.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.02.030>
80. *Yue B, Pattison E, Roberts WL, Rockwood AL, Danne O, Lueders C, Möckel M* (2008) Choline in Whole Blood and Plasma: Sample Preparation and Stability. *Clin Chem* 54(3): 590–593.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.094201>
81. *Kaplan A* (2021) Preparation, Storage, and Characteristics of Whole Blood, Blood Components, and Plasma Derivatives. *Transfus Med* 11: 59–89.
<https://doi.org/10.1002/9781119599586.ch5>
82. *Ohkawa R, Kurano M, Sakai N, Kishimoto T, Nojiri T, Igarashi K, Hosogaya S, Ozaki Y, Dohi T, Miyauchi K, Daida H, Aoki J, Okubo S, Ikeda H, Tozuka M, Yatomi Y* (2018) Measurement of plasma choline in acute coronary syndrome: importance of suitable sampling conditions for this assay. *Scient Rep* 8(1): 4725.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23009-x>
83. *Burdeynaya AL, Afanasyeva OI, Klesareva EA, Tmoyan NA, Razova OA, Afanasyeva MI, Ezhov MV, Pokrovsky SN* (2021) Role of inflammation, autotaxin and lipoprotein (a) in degenerative aortic valve stenosis in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Ther Prevent* 20(2): 2598.
<https://doi.org/10.15829/1728-8800-2021-2598>
84. *Klatt KC* (2023) Choline and phosphatidylcholine. *Encyclopedia of Human Nutrition* 162–174.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821848-8.00020-2>
85. *Liu L, Jin X, Wu Y, Yang M, Xu T, Li X, Ren J, Yan LL* (2020) A Novel Dried Blood Spot Detection Strategy for Characterizing Cardiovascular Diseases. *Front Cardiovasc Med* 7: 542519.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.542519>

Diagnostic Potential of Free Blood Choline as a Biomarker of the Physiological Status of the Organism

E. I. Savelieva^{a, *}, M. A. Leninskii^a, and N. V. Goncharov^{a, b}

^a*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology,
Leningrad Region, p.o. Kuz'molovsky, Russia*

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

**e-mail: saveleva@gpeh.ru*

Choline is an essential nutrient. Mitochondrial dysfunctions, oxidative stress and associated risks of developing non-alcoholic fatty liver disease, cardiovascular disease, muscular dystrophy, and fetal neural tube pathology are associated with insufficient choline intake. At the same time, excessive consumption of choline is associated with the accumulation in the blood of a uremic toxin – trimethylamine oxide, the bioprecursor of which is not phosphatidylcholine, but free blood choline. The content of choline and its metabolites in blood plasma is associated with different types of vascular pathologies, and allows predicting the severity of cardiovascular and other associated diseases. Contradictory information about the norm and deviations from the norm of the content of free choline in the blood plasma is due to insufficient attention to the stabilization of the content of free choline in the blood plasma at the stages preceding the instrumental analysis. When using EDTA as an anticoagulant and following a cold regimen (not higher than 4°C) immediately after blood sampling and 23 up to instrumental analysis, it is possible to avoid an increase in the concentration of choline in *ex vivo* plasma.

Keywords: free choline, blood plasma, stabilization, biomarker, risks, high performance liquid chromatography, tandem mass-spectrometry

ОБЗОРНЫЕ
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

СРОДСТВО ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ
ИНФЕКЦИИ: НОВЫЕ ГРАНИ ИЗВЕСТНОЙ ПРОБЛЕМЫ

© 2023 г. В. В. Зинчук¹, *, Н. В. Глуткина¹

¹Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

*E-mail: zinchuk@grsmu.by

Поступила в редакцию 06.07.2023 г.

После доработки 25.10.2023 г.

Принята к публикации 26.10.2023 г.

Развитие коронавирусной инфекции препятствует транспорту кислорода к тканям из-за нарушения насыщения гемоглобина в поврежденном легком. Изменение сродства гемоглобина к кислороду, являющееся наиболее важным фактором компенсации кислородной недостаточности при различных патологических состояниях, лежит в основе процессов адаптации к гипоксии. Активно обсуждается вопрос о значении сдвига кривой диссоциации оксигемоглобина при данной патологии, при которой отмечается ее сдвиг влево в артериальной крови и смещение вправо в венозной, что в условиях развития гипоксического синдрома отражает активацию механизмов компенсации кислородной недостаточности. Изменение ее положения не является специфичной для данной патологии, а определяется степенью выраженности кислородной недостаточности и разбалансированием механизмов кардиореспираторной системы, а также особенностями статуса пациентов и анализируемого образца крови.

Ключевые слова: COVID-19, кровь, кислород, газотрансмиттер, монооксид азота, сероводород, гипоксия

DOI: 10.31857/S0869813923120178, **EDN:** CIOAUA

ВВЕДЕНИЕ

Среди широкого диапазона адаптационных реакций, проявляющихся на молекулярном, клеточном и системном уровнях физиологической организации, имеет значение кислородсвязывающие свойства крови, которые могут управлять приспособительными реакциями в специфических условиях среды и при различных физиологических потребностях [1].

Гемоглобин является типовым аллостерическим белком, который определяет состояние кислородтранспортной функции (КТФ) крови. Наши представления о структурно-функциональной организации молекулы гемоглобина существенно расширились благодаря работам таких ученых, как Джозеф Баркрофт, Лайнус Полинг, Макс Перутц, Рут и Рейнгольд Бенеш, Эрнст Джаффе, Л.И. Иржак, М.В. Борисюк, М.В. Ненцкий, И.А. Залесский и многие другие. Никакая другая молекула не может быть сравнима по глубине ее познания. Гемоглобин лучше всего изучен среди всех макромолекул, но не выявил еще все свои тайны физиологического характера, не говоря уже об исследованиях на атомарном уровне.

Несмотря на то, что изучение кислородсвязывающих свойств крови имеет долгую историю, в литературе постоянно появляются обзоры по этой тематике и пред-

принимаются попытки по-новому взглянуть на эту проблему [2–7]. Несмотря на то, что гемоглобин изучен достаточно хорошо, остается еще много нерешенных вопросов, связанных с его функционированием, в частности, с исследованием молекулярных механизмов передачи сигнала от гемоглобина на другие компоненты клетки. Это тесно связано с изучением механизмов адаптации эритроцитов, их повреждений и устойчивости, а также с разработкой методов стабилизации эритроцитов и использованием данных о разных функциональных формах гемоглобина в клинико-биохимической диагностике [8]. Эта проблема приобрела новое звучание в контексте коронавирусной пандемии COVID-19 (COroNaVIrus Disease-2019), которую вызывает штамм коронавируса (SARS-CoV-2). В течение последних двух лет в ряде публикаций проводится активная дискуссия о значении сдвига кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) при данной патологии [9–12], обозначена неоднозначность трактовки сдвига ее положения и роль в генезе этой патологии. В связи с этим в данной работе изложена наша точка зрения на эту проблему.

ХАРАКТЕРИСТИКА КРИВОЙ ДИССОЦИАЦИИ ОКСИГЕМОГЛОБИНА

Адаптационные возможности эритроцитов ограничены цитоплазматическими механизмами, в которых гемоглобин играет ключевую роль, а именно, посттрансляционные модификации, стабилизирующие белок в R-конформации, что повышает его сродство к кислороду [8]. Гемоглобин является временным транспортным депо для кислорода и в этом качестве обладает рядом свойств, обеспечивающих как процесс интенсивного образования оксигемоглобина, так и процесс своевременной отдачи O_2 [13]. Молекула кислорода модифицирует структуру гемоглобина, формируя кооперативный эффект. Гемоглобин существует в равновесии между оксигенированной (релаксированное R-состояние) и дезоксигенированной (напряженное T-состояние) формами. В дезоксигенированном состоянии Fe^{2+} возвышается над остальным порфириновым кольцом, и электростатические силы стабилизируют в пределах тетрамерной молекулы нековалентные связи как внутри одной β -цепи, так и между β -цепью и соседними α -цепями, а присоединение O_2 к Fe^{2+} в оксигемоглобине оказывает воздействие не только на проксимальный гистидин, но и на всю молекулу белка, в результате чего нековалентные связи разрушаются (переход в R состояние) [14].

Присоединение кислорода к гемоглобину является ступенчатым: соединение молекулы кислорода с каждым гемом изменяет его конформацию, что обуславливает нелинейную зависимость его насыщения кислородом от парциального давления кислорода (pO_2). Процесс связывания кислорода с одной субъединицей гемоглобина влияет на взаимодействие последующих его молекул с другими субъединицами. Следует подчеркнуть, что в организме ни при каких условиях полной деоксигенации крови не наступает. Процессы насыщения крови или ее десатурации осуществляются в пределе $Hb(O_2)_2 \leftrightarrow Hb(O_2)_4$ или $Hb(O_2)_3 \leftrightarrow Hb(O_2)_4$ (рис. 1), следовательно, различия по содержанию кислорода в артериальном и венозном образцах составляют около одной трети, что является резервом O_2 , и в случае необходимости позволяет повысить или ограничить его доставку в ткани.

Этот процесс придает КДО особую S-образную форму (рис. 2), что имеет двойное значение: изменение сродства гемоглобина к кислороду (СГК), обеспечиваемое конкретным белковым окружением гемовой группы, смещает процесс связывания в область концентраций, оптимальных для функционирования этого протеина, и обеспечивает транспорт O_2 в ткани в области ограниченной его концентрации.

Положение КДО определяется действием многих факторов, и каждый из них играет определенную роль, за счет чего кривая сдвигается в точке $p50$ с 16–18 для ге-

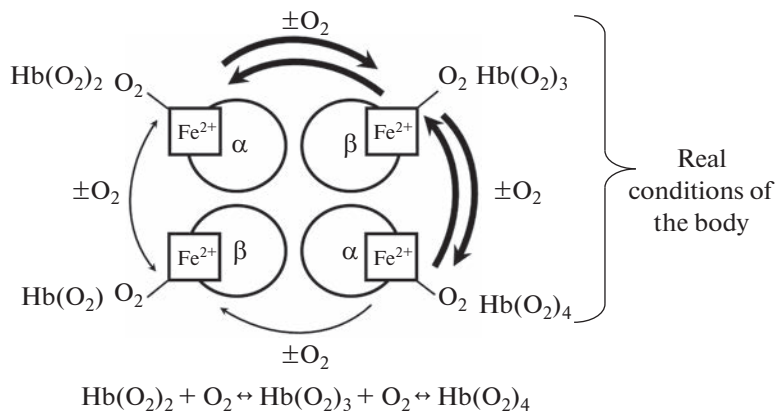


Рис. 1. Участие гемоглобина в газообмене в капиллярах большого и малого кругов кровообращения.

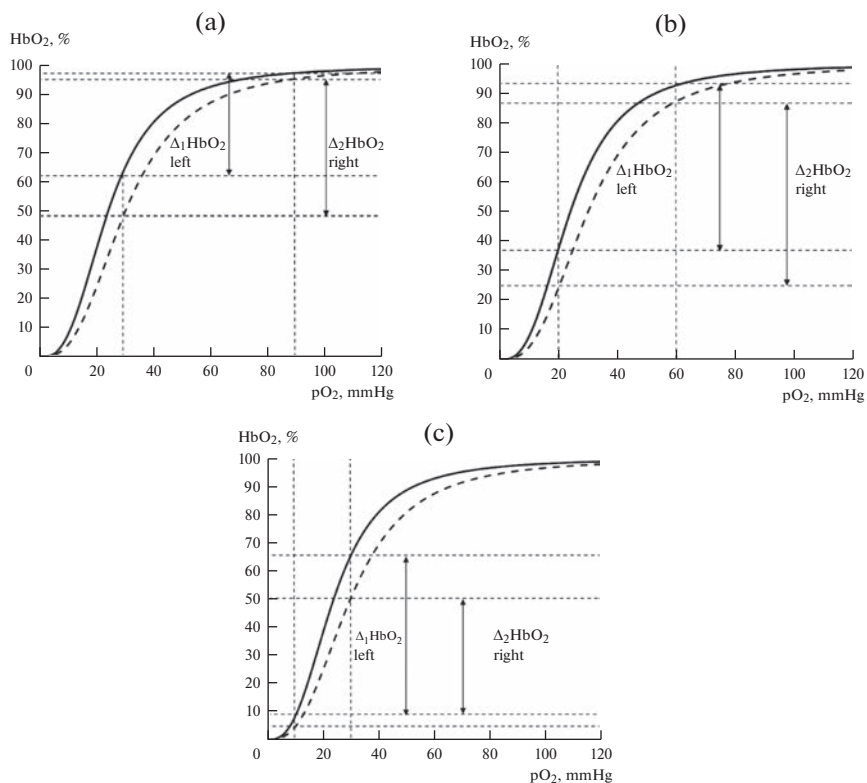


Рис. 2. Значение сдвига кривой диссоциации оксигемоглобина влево (—) и вправо (-----) для оксигенации тканей в условиях нормоксии (а), умеренной (б) и глубокой (с) гипоксии.

моглобина в чистом растворе до 26–28 мм рт. ст. в цельной крови. SGK есть результат модулирующего действия разных аллостерических эффекторов, таких как H^+ , Cl^- , CO_2 , органические фосфаты и др., обеспечивающих адаптацию к гипоксии. SGK определяется в значительной степени аллостерическим взаимодействием между гемоглобином и разными модуляторами, которые в совокупности на уровне клеточного компартмента крови образуют внутриэритроцитарную систему регуляции ее кислородсвязывающих свойств. SGK не является статичной функцией данной крови, а представляет собой динамический процесс смещения ее в ту или другую сторону, зависящей, помимо прочих факторов, от выраженности эффекта Вериги–Бора и влияния его основных компонентов: pH, CO_2 и других факторов. Следует отметить, что оксигенация гемоглобина является экзотермической реакцией, соответственно при повышении температуры крови происходит снижение SGK и его увеличение при снижении этого параметра.

КДО отражает зависимость между степенью насыщения гемоглобина кислородом и pO_2 в состоянии термодинамического равновесия. S-образная конфигурация КДО имеет определенный физиологический смысл, заключающийся в том, что оксигенация крови в легких сохраняется на высоком уровне даже при относительно низком альвеолярном pO_2 , а ее деоксигенация существенно увеличивается даже при небольшом уменьшении капиллярно-тканевого градиента pO_2 . Ее горизонтальная часть обеспечивает оксигенацию крови даже при значительном изменении pO_2 , а ее вертикальный фрагмент обуславливает оксигенацию тканей даже при незначительном изменении pO_2 .

КРИТЕРИЙ ОЦЕНКИ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ

Для характеристики SGK используют показатель $p50$ (pO_2 , при котором кровь насыщается кислородом на 50%). В смешанной венозной крови человека в покое эта величина pO_2 , обозначаемая $p50$, колеблется в диапазоне 24.5–30.2 мм рт. ст. При повышении SGK $p50$ уменьшается (КДО смещается влево), а при снижении — повышается (она сдвигается вправо). Этот показатель, как правило, используется для сравнения функциональной способности различных гемоглобинов, но в организме насыщение гемоглобина кислородом изменяется, как правило, в диапазоне от 96–98% в легких до 40–60% в венозной крови (хотя отдельные молекулы гемопротеида оксигенируются в большей или в меньшей степени).

Положение КДО рассчитывается с помощью уравнения Хилла. Существуют разные методы изучения SGK путем определения всей КДО или одной, двух и более ее точек. Классический метод предполагает приведение проб крови к равновесию с газовыми трехкомпонентными смесями с разным количеством O_2 и последующее определение кислорода в этих пробах. Метод требует значительных объемов крови, а из-за необходимости приготовления большого количества газовых смесей, сатурации крови и определения кислорода он остается трудоемким, поэтому в настоящее время применяется редко, хотя считается прецизионным. Для определения $p50$ наиболее часто используют расчетный или метод “смешивания”.

Метод “смешивания”, в основе которого лежит принцип соединения разных объемов оксигенированной и деоксигенированной крови для получения пробы крови заданной степени насыщения, отличается высокой информативностью и относительно несложностью в реализации. Данный способ и его различные модификации нашли широкое применение для изучения SGK. Сравнение данного метода с динамическим, проводившимся на крови кролика, подтверждает его высокую информативность и надежность [15]. Более того, его использование также позволяет изучать эффект Вериги–Бора. В последние годы более широко получил

распространение метод оценки СГК по показателю $p50$, определяемого расчетным способом по измеренным значениям pO_2 и SO_2 крови. Однако этот показатель применим для оценки СГК при значениях SO_2 в среднем диапазоне, а именно от 30 до 85–90%, т.е. неприемлем для оценки прежде всего артериальных образцов крови.

Был предложен также ряд новых параметров по оценке КТФ крови. Создан новый алгоритм расчета показателей кислородного гомеостаза организма в последних поколениях современных высокоточных многоволновых оксиметров (наиболее известный “Oxygen status algorithm”). В частности, исследователи фирмы “Radiometer” Siggaard-Andersen, Siggaard-Andersen [16] предложили расчет трех новых параметров кислородного обеспечения организма, кислородсвязывающих свойств крови.

Парциальное давление экстракции кислорода (p_x), т.е. величина pO_2 , необходимая для экстракции тканями 2.3 ммоль кислорода из 1 л крови. Она идентична величине p_vO_2 при которой артериовенозная разница по кислороду равна 2.3 ммоль/л. Второй параметр представляет собой содержание экстрагируемого кислорода (c_x), величина, описывающая содержание кислорода, экстрагируемого при p_vO_2 равном 38 мм рт. ст. Также ими был предложен фактор компенсации кислорода (Q_x). Его получают как отношение 2.3 ммоль/л кислорода к c_x и интерпретируют как величину сердечного выброса, необходимую для обеспечения p_vO_2 , равного 38 мм рт. ст. Эти расчетные параметры характеризуют свойства артериальной крови, и их значения базируются на реальных величинах ее pO_2 , концентрации “активного” гемоглобина (эквивалента кислородной емкости крови) и СГК.

По мнению Beasley и соавт. [2], для клинической оценки было бы более информативным изображением КДО в модифицированном виде, т.е. лучше ее представлять следующим образом: HbO_2 изображать по оси X , а pO_2 — по оси Y , что позволило бы не только преодолеть ее преобладающий вид “скользящего наклона”, но и подчеркнуть ее ключевое свойство — поддержание высокого уровня насыщения гемоглобина, несмотря на значительное снижение pO_2 . И наоборот, относительной стабильности pO_2 по мере снижения HbO_2 , что сохраняет захват O_2 гемоглобином несмотря на снижение pO_2 , и доставку O_2 в ткани (т.е. облегчает как захват O_2 , так и его поступление в ткани). Данный подход не имеет принципиальной новизны, является весьма дискуссионным и может быть оправдан только для лучшего понимания физиологического значения сдвигов КДО.

Очевидна необходимость внедрения в клинических лабораториях методов оценки эритрокринной функции организма, связанных с регуляцией кислородсвязывающей способности гемоглобина, что позволит выбрать наиболее подходящее лечение для конкретного пациента [17].

ЗНАЧЕНИЕ СДВИГА ПОЛОЖЕНИЯ КРИВОЙ ДИССОЦИАЦИИ ОКСИГЕМОГЛОБИНА

СГК критически определяет доступность кислорода в ткани, и его повышение способствует развитию тканевой гипоксии, однако индивидуальные различия $p50$ не всегда учитываются в клинической практике [18]. Обсуждается вопрос: более высокое или более низкое СГК является более выгодным для организма, когда доступность кислорода ограничена. У лиц с генетическими мутациями в структуре гемоглобина, приводящие к высокому СГК, наблюдается во время гипоксии, покоя и во время физической нагрузки ослабление механизмов регуляции кардиореспираторной системы [7]. Проблема, какое СГК является оптимальным для доставки кислорода тканям при различных условиях, обсуждается и не получила однозначного ответа. У пациентов с нормальным содержанием кислорода, но сниженным сердечным выбросом снижение СГК благоприятно для улучшения до-

Таблица 1. Эффект изменения значения $p50$ для артериальной и капиллярной крови при различных значениях HbO_2 и pO_2 [5, в нашей модификации]

Параметр	Нормоксия	Гипоксия	Нормоксия	Гипоксия	Нормоксия	Гипоксия
$p50_{арт}$, мм рт. ст.	24 (сдвиг КДО влево)		26.8		30 (сдвиг КДО вправо)	
$pO_{2арт}$, мм рт. ст.	90	45	90	45	90	45
$HbO_{2арт}$, %	97.8	85.2	96.9	80.7	95.8	75.2
$p50_{кап}$, мм рт. ст.	26.8 (сдвиг КДО влево)		30		33.5 (сдвиг КДО вправо)	
$pO_{2кап}$, мм рт. ст.	30	15	30	15	30	15
$HbO_{2кап}$, %	57.4	19.4	49.9	15.4	42,2	13.1
ΔHbO_2 , %	40.4	65.8	47	65.3	53.6	62.1

ставки кислорода в периферические ткани, однако в условиях гипоксии или при ограниченном потреблении кислорода легкими в кислородном каскаде, увеличение SGK является более полезным [12].

В капиллярах малого круга кровообращения повышенное SGK (сдвиг влево КДО) имеет преимущество, а для большого круга – наоборот. Уменьшение SGK, т.е. сдвиг КДО вправо, повышает отдачу кровью кислорода тканям на уровне капилляров большого круга кровообращения. Снижение SGK (увеличение $p50$), являющееся наиболее важным фактором компенсации кислородной недостаточности при различных патологических состояниях, лежит в основе процессов адаптации к гипоксии. Увеличение $p50$ выше физиологических значений благоприятствует росту потока кислорода к тканям преимущественно в условиях нормоксии или умеренной гипоксии (рис. 2а, б). При выраженной гипоксии сдвиг КДО влево увеличивает поток кислорода в ткани организма (рис. 2с), что является адаптивной реакцией организма при различных состояниях с развитием кислородной недостаточности.

Оценка физиологического значения сдвига КДО влево для организма является неоднозначной, несмотря на большое число исследований. Известный специалист в области физиологии Samaja [19] проанализировал несколько десятков статей, посвященных этой проблеме, и указал на различные эффекты сдвига КДО вправо и влево по физиологической значимости. Повышение SGK затрудняет десатурацию крови в микроциркулярном русле большого круга кровообращения, но способствует насыщению кислородом в капиллярах легкого. Высокое SGK определено как потенциально выгодная адаптация к высоте, но с точки зрения кардиореспираторной системы предполагается, что оно полезно для организма при действии гипоксии как в покое, так и при физической нагрузке. Во время гипоксии у лиц с высоким SGK наблюдается уменьшение частоты сердечных сокращений, снижение образования эритропоэтина и более высокое насыщение O_2 артериальной крови в покое по сравнению с тем, у кого обычное SGK [7]. Эффект изменения $p50$ (SGK) на величину артерио-венозной разницы по оксигемоглобину аргументируется расчетами, представленными в табл. 1. Как видим, значение артерио-венозной разницы в условиях нормоксии или умеренной гипоксии наибольшее при увеличении $p50$, но в условиях выраженной гипоксии при уменьшении $p50$ оно, наоборот, увеличивается [5].

Изменения SGK отражает необходимость организма приспосабливаться к постоянно меняющимся потребностям тканей в кислороде, а также степень развивающейся гипоксии и выраженность реакции адаптации к ней.

СРОДСТВО ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ ПРИ COVID-19

При COVID-19 наблюдается существенное нарушение кислородного обеспечения организма. Эта патология характеризуется выраженными признаками кислородной недостаточности. Серьезную проблему представляет острый респираторный дистресс-синдром при развитии тяжелой вирусной пневмонии, обладающий молниеносной скоростью развития и высокой летальностью, для которого характерно первичное поражение бронхо-легочной системы и дыхательная недостаточность [20]. У пациентов данной категории отмечается уменьшение насыщения артериальной крови (менее 93.0% в 55.7% случаев) [21]. Гипоксия и ацидоз приводят к дисрегуляции иммунной системы, разнонаправленным про- и противовоспалительным реакциям, в результате чего развивается “цитокиновый шторм” [22].

Патологически измененные легочные сосуды при COVID-19 вызывают увеличение времени газообмена кислорода в капиллярах (явление “диффузионного ограничения”), в связи с чем вентиляционно-перфузионное распределение, величина поражения легкого часто не пропорциональны степени тяжести гипоксемии [23]. Выдвинута гипотеза о потенциальной полезности так называемого “гипоксического кондиционирования” для активации образования индуцируемого гипоксического фактора-1 α , как механизма цитозащитной сигнализации, улучшающего функционирование жизненно важных органов при этой патологии [24].

Вентиляционно-перфузионное несоответствие, начиная от шунтов и заканчивая вентиляцией физиологического альвеолярного мертвого пространства, является центральным фактором в генезе гипоксии при этой патологии [25]. При COVID-19 у многих пациентов в состоянии покоя наблюдается заметный разрыв между глубиной гипоксемии и степенью дыхательной недостаточности, т.е. развивается “счастливая” (“тихая”) гипоксемия с быстрым ухудшением состояния [26]. Вирус SARS-CoV-2, в первую очередь, поражает легочную ткань и нарушает газообмен, что приводит к острому, респираторному дистресс-синдрому и системной гипоксии, в связи с чем исследование молекулярных механизмов позволит разработать новые таргетные методы лечения COVID-19 [24]. В условиях данного заболевания претерпевают серьезные изменения практически все составляющие микроциркуляторно-тканевых систем, от поражения сосудистой стенки до активации коагуляционного потенциала крови, изменения реологических свойств крови, морфологических и структурных нарушений в мембранах эритроцитов и их кислородсвязывающей функции [27].

При COVID-19 претерпевают серьезные изменения практически все составляющие микроциркуляторно-тканевых систем, начиная от сосудистой стенки, коагуляционного потенциала крови, ее реологических свойств, структуры мембраны эритроцитов и их кислородтранспортной функции [27]. При коронавирусной инфекции так же, как и при многих воспалительных процессах, происходят классические патофизиологические изменения: нарушение микроциркуляции, ацидоз, повреждение мембраны эритроцитов, ведущие к развитию анемии. В ее генезе имеет значение снижение содержания ферритина, ответственного за создание депо железа в организме, повышенный расход железа, нарушение гемопоэза [28]. Также важная роль в этом принадлежит пептиду острой фазы воспаления – гепцидину, который индуцирует деградацию ферропортина и блокирует избыточное поступление железа, необходимого для синтеза молодых эритроцитов и поддержания должного количества гемоглобина. Гепцидин в ответ на воспаление вызывает гипоферремию путем блокировки главных путей поступления железа в кровь, ограничивая его доступность для синтеза гемоглобина и эритропоэза, инициируя анемию воспаления [29]. Кроме того, свободный гемоглобин, являясь высокочитотоксическим прооксидантом, инициирует воспалительный каскад и свободнорадикальные процессы с развитием эндотелиальной дисфункции [30].

Показано, что в эритроцитах пациентов с COVID-19 на фоне нарушенного липидного гомеостаза мембраны, N-концевой цитозольный домен мембранного белка полосы 3 активирует окисление структурных белков с внутренней стороны мембраны, нарушается энергетический метаболизм клетки [31]. SARS-CoV-2, воздействуя на рецепторы CD147, CD26 и ангиотензинпревращающий фермент 2, расположенные на эритроцитах, может вызывать возникновение гемолитической анемии [17]. Кроме того, непосредственно гемоглобин эритроцитов может быть потенциальной мишенью для SARS-CoV-2 [32]. Белок ORF8 и поверхностный гликопротеин вируса связывается с порфирином, а белки ORF1ab, ORF10 и ORF3a взаимодействуют с β -цепью гемоглобина, нарушая его газотранспортную функцию, снижая эффективность газообмена [33]. Однако в ретроспективном исследовании DeMartino и соавт. [37] не наблюдалось признаков повреждения гемоглобина и гемолиза во время инфекции SARS-CoV-2. Эта инфекция и связанные с ней воспалительные заболевания приводят к нарушению функции эритрокрина с последующими воспалительными осложнениями и эндотелиальной дисфункцией из-за дефицита защитных молекул (NO, сфингозин-1 фосфат и АТФ) из эритроцитов [34]. Понимание роли эритроцитов в COVID-19 может помочь в выборе и в методах лечения этой инфекции [17], что предполагает важность нарушений КТФ крови в течение этой патологии. Изменение SGK, являющееся наиболее важным фактором компенсации кислородной недостаточности при различных патологических состояниях, лежит в основе процессов адаптации к гипоксии [6]. Однако его значение, особенно в зависимости от тяжести течения COVID-19, до настоящего времени не выяснено, а имеющиеся работы по этому вопросу единичны и противоречивы.

Положение КДО при COVID-19 исследовалось в ряде работ. Согласно данным Vogel и соавт. [35] значение $p50$ снижается до 23.4 при коронавирусной инфекции (при повреждении не только легких, но и при анемии) по сравнению с 26.7 мм рт. ст. у здоровых лиц. В другом исследовании не было выявлено существенных различий в значениях $p50_{\text{станд}}$ у 14 пациентов с COVID-19 (29.0 ± 2.3 в сравнении со здоровыми 28.5 ± 1.8 мм рт. ст.) на фоне выраженной анемии (9.3 ± 2.3 г/дл) [36]. У пациентов при этой патологии рассчитанные стандартные КДО были незначительно, но достоверно смещены влево на 0.1 мм рт. ст. по сравнению с контрольной группой (27.5 ± 0.2 мм рт. ст.), но расчетный коэффициент эффекта Вериги–Бора для CO_2 был снижен при этом. По данным DeMartino и соавт. [37] при этой патологии отмечается тенденция сдвига КДО вправо.

Был проведен ретроспективный анализ SGK артериальной крови в когорте тяжелобольных пациентов с COVID-19 в течение различных временных периодов во время пребывания в отделении интенсивной терапии, в результате чего был выявлен сдвиг КДО влево (значение $p50$ в начале и в конце лечения составляло 20.63 ± 2.1 против 18.68 ± 3.3 мм рт. ст., $p = 0.03$), а $p50$ у пациентов с летальным исходом оно имело большее значение, чем у выживших с данной патологией (24.1 против 18.45 мм рт. ст., $p = 0.01$) [38]. В другой работе при ретроспективном исследовании газового состава крови у пациентов с COVID-19 было выявлено значение $p50$ 26 (25.2 – 26.8) против 25.9 (24 – 27.3) мм рт. ст. ($p = 0.42$), и более низкое его значение в группе с высоким уровнем карбоксигемоглобина; не было выявлено различий в динамике $p50$ между 1-ми и 18-ми сутками заболевания [32]. По данным Renoux и соавт. [39] измерение $p50$ у 7 пациентов с помощью Nemox-Analyzer не выявило значимых отличий этого параметра в сравнении со здоровыми. Согласно исследованиям Bergamaschi и соавт. [40] измерение стандартного $p50$ *in vitro* у 289 пациентов с этим заболеванием характеризуется отсутствием его изменений, но наблюдался низкий уровень $p50$ *in vivo* (этот эффект был более выражен у выживших пациентов, чем у умерших: 25.2 (24.4 – 26.3) против 25.8 (24.7 – 26.9), $p < 0.012$, мм рт. ст.).

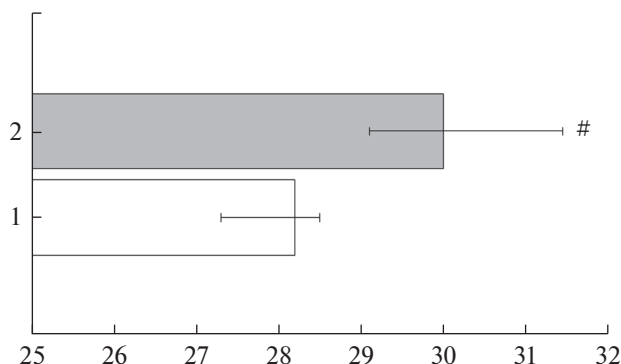


Рис. 3. Значение показателя сродства гемоглобина к кислороду $p50$ у здоровых лиц (1) и у пациентов с коронавирусной инфекцией (2).

Изменения статистически значимы (критерий Манна–Уитни) по отношению к здоровым лицам — #.

У 517 пациентов, госпитализированных с коронавирусной инфекцией, у которых выполняли анализ артериальной крови при госпитализации (т.е. до лечения), выявили более низкие значения $p50_{\text{станд}}$ у 76% и $p50_{\text{реал}}$ у 85% на протяжении 18 сут лечения в сравнении с исходным уровнем [41].

Ухудшение функции легких при COVID-19 повышает важность альтернативных механизмов компенсации, которые обеспечивают потребление кислорода, в частности, SGK [12]. Daniel и соавт. [36] предполагают, что функция переноса кислорода гемоглобином у пациентов с данной инфекцией не нарушается как для венозной, так и артериальной крови. Однако это не исключает возможности значительного отклонения КДО вправо на аэрогематическом уровне у пациентов с тяжелой формой COVID-19, что может быть фактором, усугубляющим развитие гипоксии [42].

Однако следует отметить, что в большинстве приведенных работ проводилась оценка КТФ только артериальной крови, и это могло повлечь к погрешности в расчете значений $p50$. Разнообразие значений $p50$ необходимо учитывать в условиях нарушения оксигенации тканей, и для его прогнозирования рекомендуется оценивать только образцы венозной, а не капиллярной крови [18], тем более артериальной.

По нашим данным, у пациентов с коронавирусной инфекцией ($n = 15$) на 4–5-е сут от начала заболевания с достаточно низким значением spO_2 ($>93\%$), которым проводилась кислородная ингаляция, КДО венозной крови сдвигается вправо [43]. У данных пациентов по сравнению со здоровыми лицами наблюдалось снижение SO_2 , pCO_2 увеличение pH крови. Выявлен рост показателя $p50_{\text{станд}}$ (на 14.0%, $p < 0.05$), что, очевидно, является типичной реакцией на гипоксию в тканях, возникшую из-за недостаточности легочного кровообращения. Показатель $p50_{\text{реал}}$ увеличился по сравнению с контрольной группой на 6.4%, $p < 0.05$ (рис. 3). Вероятно, это связано с некоторым истощением компенсаторной реакции организма, на что указывает уменьшение содержания pO_2 и SO_2 в венозной крови. Увеличение $p50$ и соответственно сдвиг кривой диссоциации вправо способствует росту потока кислорода в ткани при небольшом изменении pO_2 [44].

В работах приводимых выше исследователей изучалась только артериальная кровь, а в нашем исследовании изучались газовые показатели венозной крови, взятой из v. subitalis, что является принципиально важным для оценки ее КТФ. Артериальная и венозная кровь отличаются по содержанию факторов регуляции сродства гемоглобина к кислороду. Венозная кровь в значительной степени интеграль-

но отражает процессы оксигенации тканей. Сдвиг КДО венозной крови вправо в условиях развития коронавирусной инфекции отражает попытку организма компенсировать кислородную недостаточность, но в условиях цитокинового шторма, окислительного стресса, когда нарушена утилизация кислорода тканями и значительная его часть используется в оксигеназных реакциях, ведущих к образованию активных форм кислорода, это может содействовать усилению активности процессов свободнорадикального окисления.

Таким образом, при COVID-19 в реальных условиях организма имеет место сдвиг КДО вправо в венозной крови, что увеличивает поступление O_2 из крови в ткани, а влево — уменьшает, а в артериальной крови — наоборот, КДО сдвигается влево, что способствует возрастанию насыщения крови кислородом в легких на уровне капилляров малого круга кровообращения.

МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЕНИЯ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Адаптация к гипоксии, направленная на сохранение жизнедеятельности организма в условиях дефицита кислорода, контролируется как центральными, так и периферическими механизмами, необходимыми для поддержания внутриклеточного уровня кислорода. Развитие COVID-19 препятствует транспорту кислорода к тканям из-за нарушения насыщения гемоглобина в поврежденном легком, так и из-за снижения концентрации гемоглобина с последующим уменьшением объема доставляемого кислорода [10].

Через внутриэритроцитарный механизм положение КДО может значительно изменяться в зависимости от потребностей организма в кислороде. Аллостерические эффекторы управления R-/T-конформацией гемоглобина обеспечивают формирование кислородсвязывающих свойств крови в широком физиологическом диапазоне в соответствии с потребностями организма. Благодаря действию модуляторов создаются условия модификации свойств гемоглобина во время циркуляции в сосудистом русле, что формирует его определенную конформацию с иным сродством к кислороду.

Среди различных факторов, определяющих положение КДО, важное значение имеет эффект Вериго—Бора. Данный эффект представляет собой саморегулирующийся механизм доставки кислорода в ткани при гипоксических условиях, при возникающем тканевом ацидозе, который через обратную связь обеспечивает аллостерический контроль SGK [45]. Предполагается, что патогенез тяжелых форм коронавирусной инфекции, как и многих воспалительных заболеваний, может быть связан с ацидозом, так как в соответствии с эффектом Вериго—Бора снижение рН крови приводит к снижению насыщения крови кислородом (рис. 4), что обуславливает ухудшение состояния пациента [22]. Истощение буферной способности крови и в целом ресурсов организма, необходимых для сдерживания развивающегося ацидоза, имеет решающее значение для снижения сатурации крови. В условиях снижения рН и повышения напряжения CO_2 (ацидоз и гиперкапния) можно предполагать сдвиг КДО вправо [27].

Высказано предположение, что сохранение насыщения кислородом, несмотря на низкое pO_2 в образцах артериальной крови, происходит из-за сдвига КДО влево, вызванного гипервентиляцией и гипоксемией, а также из-за возможных прямых взаимодействий вируса с гемоглобином [25]. При интенсивном обмене веществ, ведущем к снижению значения рН, гемоглобин легче отдает O_2 , связывая при этом избыточные протоны, обеспечивая тем самым эффективный транспорт кислорода от легких к тканям и перенос углекислого газа (в основном в виде бикарбоната) в обратном направлении, образуя систему регуляции метаболитов с отрицательной

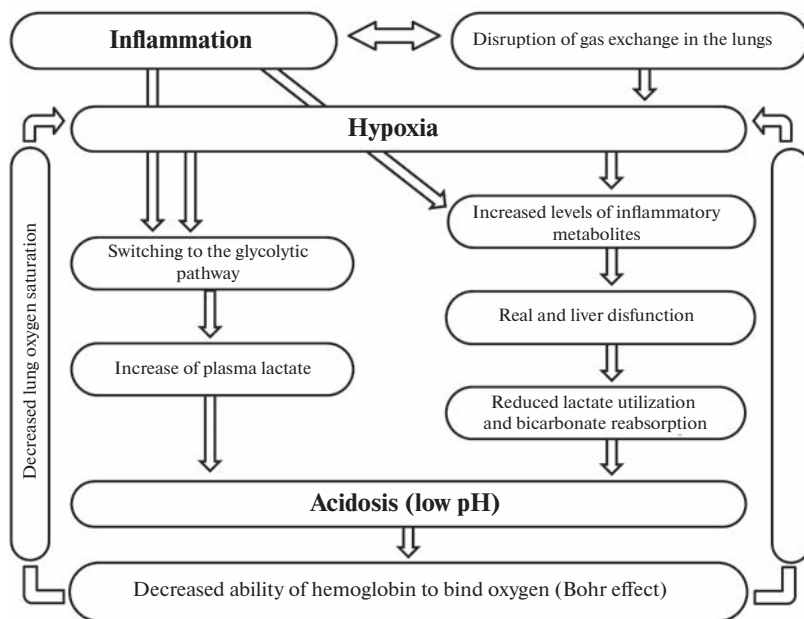


Рис. 4. Диаграмма, иллюстрирующая систему прямой и обратной зависимости между воспалением, гипоксией и насыщением крови [22].

обратной связью, основанную на кооперативном рН-зависимом изменении конформации гемоглобина (эффект Вериги–Бора) [22].

Важными гетеротропными эффекторами гемоглобина являются H^+ , CO_2 и внутриэритроцитарные органические фосфаты, а именно 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ), который является мощным модулятором СГК. Увеличение его концентрации приводит к смещению КДО вправо, а снижение вызывает противоположный эффект. Образование лактата сопровождается накоплением 2,3-ДФГ (шунт Раппопорта) с миграцией последних в эритроциты. Этот модулятор 2,3-ДФГ входит в состав гемоглобина путем образования солевого мостика между β -субъединицами гетеротетрамера, что предотвращает связывание кислорода.

Анемия различной степени тяжести достаточно широко распространена при COVID-19 [17]. Увеличение дефицита кислорода может приводить к запуску синтеза 2,3-ДФГ, молекулы, стабилизирующей гемоглобин в дезоксиформе, что, инициируя сдвиг КДО вправо, должно улучшать снабжение тканей кислородом. Предполагается, что при тяжелой анемии при COVID-19 происходит смещение КДО вправо из-за возможного адаптивного увеличения концентрации 2,3-ДФГ, однако нет убедительных данных о повышении этого модулятора СГК при этой патологии [10, 35].

Важно также учитывать влияние температуры крови на значение $p50$, так как у многих пациентов при этой патологии наблюдается лихорадка (примерно у 80% она выше $38^\circ C$, что смещает КДО вправо, а $p50$ повышается почти на 3 мм рт. ст. при подъеме температуры на $2^\circ C$) [12]. Температура выступает как регулятор функций гемоглобина в связи с тем, что оксигенация гемической группы является экзотермической реакцией (СГК уменьшается с ростом температуры), а общая энтальпия оксигенации обусловлена эндотермическим вкладом регуляторных молекул,

которые преимущественно связываются с дезоксигемоглобином и модулируют связывание либо отщепление O_2 [46].

Следует отметить, что при оценке $r50$ может возникнуть ситуация, когда изменения этого показателя не выявляются, что возможно при выраженных, противоположно направленных, взаимно компенсирующих сдвигах факторов, в частности, при дефиците 2,3-ДФГ, компенсируемом адаптивным поведением, кислой реакцией среды эритроцита, в этом случае уровень $r50$ остается стабильным, однако это не означает, что КТФ крови при подобном сочетании взаимодействующих факторов следует признать нормальным.

В терапии COVID-19 используются средства, повышающие SGK: 5-гидроксиметил-2-фурфурал, стимулирующих эритропоэз – эритропоэтин, метиленовый синий. Образующий повышенный уровень метгемоглобина может выступать в качестве потенциальной причины смещения КДО влево, особенно у пациентов, принимающих препараты, способствующие образованию метгемоглобина (такие как хлорохин и гидрохлорохин) [10].

Важно оценивать значение различных субстанций, влияющих на SGK (например, АТФ, Cl^- , лактат, глутатион), которые могут играть определенную роль в этом процессе, их вклад должен быть изучен. Особо следует оценить роль газотрансммиттера монооксида азота (NO), поскольку механизм его связывания с гемоглобином подобен образованию его метформы при высоком насыщении кислородом в легких, но изменяется в тканевых капиллярах [10].

Полученные в разных исследованиях данные о характере изменения кислородсвязывающих свойств крови в условиях развития COVID-19 отражают функционирование механизмов относительно автономной системы регуляции ее свойств. Она обеспечивает адаптивное поведение кислородсвязывающих свойств крови при перестройке характера ее функционирования, в целом всей системы транспорта кислорода на разных ее уровнях.

ЗНАЧЕНИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ (NO, H_2S) В ИЗМЕНЕНИИ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ ПРИ COVID-19

Почти у всех пациентов с COVID-19 отмечается системное повреждение сердечно-сосудистой системы [47], которая сопровождается выраженным повреждением эндотелия (иногда для подчеркивания этого используют термин “эндотелиит”) [48]. Возникшая дисфункция эндотелия при коронавирусной инфекции характеризуется нарушением способности поддерживать нормальную функцию сосудов, а также приводит к изменению образования различных газотрансммиттеров. NO является ключевой сигнальной молекулой, которая выполняет ряд физиологических функций для поддержания сосудистого гомеостаза, а снижение ее доступности связано с прогрессированием сердечно-сосудистых заболеваний и повышает риск развития патогенных явлений [49]. Этот фактор является универсальным, который регулирует многие физиологические процессы при низких концентрациях, но вреден при более высоких концентрациях [50].

Можно предположить участие системы газотрансммиттеров в изменении кислородсвязывающих свойств крови, прежде всего, NO и H_2S . Как известно, данные газотрансммиттеры вносят вклад в модификацию SGK, что достигается через различные механизмы: образование различных дериватов гемоглобина, модулирование внутриэритроцитарной системы, а также опосредовано через системные механизмы формирования функциональных свойств гемоглобина [51]. В этом аспекте представляет интерес работа Mortaz и соавт. [52], в которой показано увеличение содержания внутриэритроцитарного NO у пациентов с COVID-19. В другом исследовании показано, что пациенты с тяжелой формой этой патологии имеют более низ-

кие уровни HbNO и нитритов/нитратов, а также более высокий уровень перекисей липидов, являющихся индикатором окислительного стресса, что снижает биодоступность NO и является фактором развития эндотелиальной дисфункции [50]. Измерение величины фракционного NO в выдыхаемом воздухе у пациентов с COVID-19 выявило его более низкое значение, особенно при тяжелом исходе [53].

В нашем исследовании у пациентов ($n = 15$) с инфекцией SARS-CoV-2 установлено повышенное содержание $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ плазме крови до 28.07 (17.74; 37.74) ($p < 0.05$) мкмоль/л и снижение H_2S до 5.81 (5.22; 8.29) ($p < 0.05$) мкмоль/л в сравнении со здоровыми 15.42 (14.48; 17.71) и 29.01 (25.21; 37.03) мкмоль/л соответственно [43]. Известно, что газотрансмиттеры (NO и H_2S) выполняют роль аллостерического эффектора функциональных свойств гемоглобина, которые изменяют его сродство к кислороду и таким образом влияют на транспорт O_2 [54]. Наблюдаемое изменение содержания данных газотрансмиттеров (повышение концентрации нитрат/нитритов и снижение уровня H_2S), вносит вклад в изменение СГК. Концентрация NO- и H_2S -производных гемоглобина в крови невелика, на каждый из этих дериватов приходится несколько сотен молекул обычного гемоглобина, что относительно мало для их выраженного влияния на кислородсвязывающие свойства крови в обычных условиях, но при патологических состояниях при более высоких концентрациях, выше физиологических, их эффект на модуляцию кислородсвязывающих свойств крови может проявляться более существенно, что может иметь важное значение для процессов газообмена на уровне капилляров.

Система газотрансмиттеров формирует своеобразный щит, ограничивающий действие повреждающих факторов. При создании средств коррекции, изменяющих содержание NO, необходимо учитывать, что данный фактор участвует, как в нормальной регуляции, так и во многих патологических процессах [55], в связи с чем оптимальным будет ограничение гиперпродукции или компенсации недостатка NO в организме, не затрагивая его существенные регуляторные и защитные функции. Гипоксия является фактором, изменяющим активность различных изоформ NO-синтазы: активировывает индуцибельную, но ингибирует эндотелиальную изоформу фермента.

Выявлен новый сигнальный путь, который регулирует способность переноса кислорода в эритроцитах и реализуется через участие газотрансмиттера H_2S в продукции 2,3-ДФГ в эритроцитах с последующим повышением СГК [56]. При нормоксии H_2S уменьшает транслокацию гемоглобина из цитозоля в мембрану, способствует закреплению дифосфоглицератамутаза на мембране и тем самым снижает уровень 2,3-ДФГ, а при гипоксии снижение уровня H_2S способствует закреплению гемоглобина на мембране и высвобождению дифосфоглицератамутаза, что, в конечном итоге, приводит к увеличению продукции 2,3-ДФГ в эритроцитах. Несомненно, данный газотрансмиттер участвует в модификации СГК, что достигается через различные механизмы: образование сульфгемоглобина, модулирование L-аргинин-NO системы, а также опосредовано через системные механизмы. Метаболизм H_2S является частью кислородсенсорного механизма: в обычных условиях данный газотрансмиттер окисляется в митохондриях до сульфита, при гипоксии его утилизация уменьшается, в связи с чем возрастает его вклад в гипоксический ответ [57].

Газотрансмиттеры (NO, H_2S а также монооксид углерода CO) выполняют роль аллостерических модуляторов в отношении гемоглобина, изменяя его сродство к кислороду и определяя состояние КТФ крови (рис. 5). Газотрансмиттер H_2S участвует в формировании функциональных свойств гемоглобина путем модификации его сродства к кислороду через системные и регионарные, внутриэритроцитарные

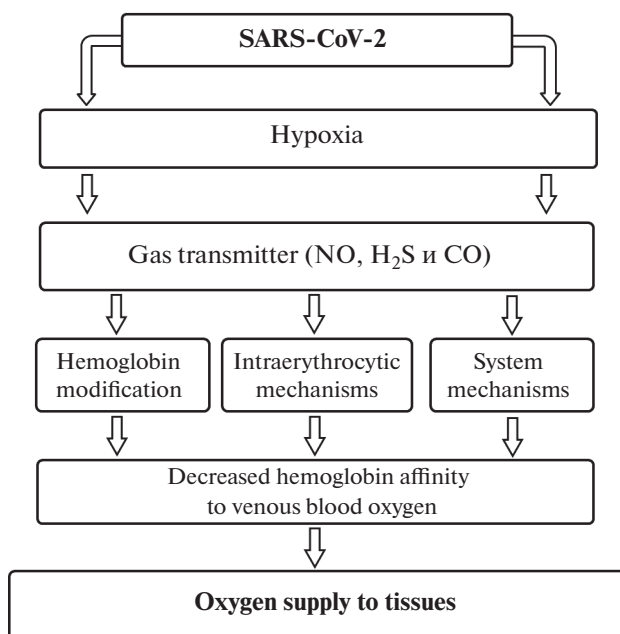


Рис. 5. Механизмы изменения сродства гемоглобина к кислороду венозной крови при коронавирусной инфекции.

механизмы регуляции, что имеет значение в патогенезе гипоксического состояния при коронавирусной инфекции.

Многие физиологические эффекты H₂S обусловлены его взаимодействием с другими газообразными посредниками (NO, CO), осуществляемым как на уровне регуляции ферментов синтеза, так и мишеней их действия. Исходя из этого, предлагается рассматривать газомедиаторы не по отдельности, а как союз молекул, регулирующих клеточные процессы [46]. H₂S занимает особую позицию в регуляции физиологических процессов, в частности, сократительных реакций сосудистых гладких мышц, его вазорелаксирующее влияние обусловлено не только дисфункцией эндотелиально-гладкомышечных взаимоотношений, но и тесным взаимодействием с NO-зависимыми механизмами [58]. Это относится и к его эффектам на красные клетки крови. Показано, что донор H₂S – NaHS в физиологической концентрации (6×10^{-5} М) улучшает деформируемость эритроцитов, действуя односторонне и сходно по величине с эффектом донора NO (нитропруссидом натрия), однако в более высокой концентрации (10^{-3} М) NaHS снижает деформируемость эритроцитов за счет увеличения предела текучести мембраны [59]. Согласно нашему исследованию, отмечается рост содержания NO и снижение H₂S, свидетельствуя о разнонаправленной активности механизмов генерации этих газотрансмиттеров [60]. Механизмы транспорта кислорода кровью являются важнейшими мишенью эффектов NO и H₂S. Нарушение газотрансмиттеробразующей функции приводит к ухудшению кислородсвязывающих свойств крови, и как следствие, к снижению адекватного обеспечения кровотоком тканевых потребностей в кислороде, развитию гипоксического синдрома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Состояние внутриэритроцитарной системы регуляции СГК существенно влияет на мобильность изменений крови, и в то же время данная автономная система, работающая по принципу обратной связи, способна независимо от условий циркуляции поддерживать адаптивные свойства крови. В реальных условиях организма при COVID-19 действие разных модуляторов обуславливает изменение СГК, что особо важно для обеспечения адекватного кислородного потока в ткани и может быть использовано для устранения кислородного дефицита.

Смещение КДО артериальной крови влево при коронавирусной инфекции способствует насыщению кислородом, а ее сдвиг в венозной крови вправо в условиях развития гипоксического синдрома организма отражает активацию механизмов компенсации кислородной недостаточности, направленных на улучшение оксигенации тканей. Изменение ее положения не является, очевидно, специфичной для данной патологии, а определяется степенью выраженности кислородной недостаточности и разбалансированием механизмов кардиореспираторной системы. В целом полученные данные о положении КДО при этой патологии являются ярким примером мультифакторного процесса изменения ее сдвигов. Положение КДО при COVID-19 может быть обусловлено особенностью статуса пациентов с этой патологией (степень тяжести, стадия заболевания, величина повреждения легких, особенности терапии и другое), а также особенностью образца исследуемой крови.

Таким образом, анализ литературы и собственные результаты выполненных исследований, посвященных изучению СГК и механизмов его регуляции при коронавирусной инфекции, указывают на актуальность данной проблемы, неоднозначность во взглядах на ее трактовку и свидетельствуют о необходимости дальнейшего более глубокого исследования, что позволит осуществить поиск оптимальных средств коррекции дефицита кислорода при этой патологии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований Республики Беларусь № договора 30-24/549-21.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция (В.В.З., Н.В.Г.), написание текста (В.В.З., Н.В.Г.), оформление рисунков (Н.В.Г.), редактирование рукописи (В.В.З., Н.В.Г.), критический пересмотр на предмет интеллектуального содержания (Н.В.Г.), утверждение финального варианта статьи для публикации (В.В.З., Н.В.Г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weber RE, Fago A* (2004) Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins. *Respir Physiol Neurobiol* 144(2-3): 141–159.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.04.018>
2. *Beasley R, McNaughton A, Robinson G* (2006) New look at the oxyhaemoglobin dissociation curve. *Lancet* 367(9517): 1124–1126.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68488-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68488-2)
3. *Michel D* (2008) An alternative theoretical formula for hemoglobin oxygenation. *Eur Biophys J* 37(6): 823–827.
<https://doi.org/10.1007/s00249-008-0283-2>

4. *Mairbäurl H, Weber RE* (2012) Oxygen transport by hemoglobin. *Compr Physiol* 2(2): 1463–1489.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c080113>
5. *Storz JF* (2016) Hemoglobin-oxygen affinity in high-altitude vertebrates: is there evidence for an adaptive trend? *J Exp Biol* 219(20): 3190–3203.
<https://doi.org/10.1242/jeb.127134>
6. *Srinivasan AJ, Morkane C, Martin DS, Welsby IJ* (2017) Should modulation of p50 be a therapeutic target in the critically ill? *Expert Rev Hematol* 10(5): 449–458.
<https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1313699>
7. *Webb KL, Dominelli PB, Baker SE, Klassen SA, Joyner MJ, Senefeld JW, Wiggins CC* (2022) Influence of High Hemoglobin-Oxygen Affinity on Humans During Hypoxia. *Front Physiol* 12: 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.763933>
8. *Kosmachevskaya OV, Topunov AF* (2019) Electrophilic signaling: the role of reactive carbonyl compounds. *Biochemistry* 84(1): 3–23.
<https://doi.org/10.1134/S0320972519010019>
9. *Laredo M, Curis E, Masson-Fron E, Voicu S, Megarbane B* (2021) Does COVID-19 alter the oxygen-hemoglobin dissociation curve? — An observational cohort study using a mixed-effect modeling. *Clin Chem Lab Med* 59: e416–419.
<https://doi.org/10.1515/ccm-2021-0387>
10. *Böning D, Kuebler WM, Bloch W* (2021) The oxygen dissociation curve of blood in COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 321(2): L349–L357.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00079.2021>
11. *Gille T, Sesé L, Aubourg E, Bernaudin JF, Richalet JP, Planès C* (2022) Is there a shift of the oxygen-hemoglobin dissociation curve in COVID-19? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 322(1): L174–L175.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00390.2021>
12. *Böning D, Kuebler WM, Vogel D, Bloch W* (2023) The oxygen dissociation curve of blood in COVID-19—An update. *Front Med (Lausanne)* 10: 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1098547>
13. *Рябов ГА* (1988) Гипоксия критических состояний. М. Медицина. [Ryabov GA (1988) Hypoxia of critical conditions. M. Medicine. (In Russ)].
14. *Иржак ЛИ, Гладилов ВВ, Мойсеев НА* (1985) Дыхательная функция крови в условиях гипероксии. М. Медицина. [Irzhak LI, Gladilov VV, Moiseenko NA (1985) Respiratory function of blood under conditions of hyperoxia. M. Medicine. (In Russ)].
15. *Scheid P, Meyer M* (1978) Mixing technique for study of oxygen-hemoglobin equilibrium: a critical evaluation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 45(5): 818–822.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1978.45.5.818>
16. *Siggaard-Andersen M, Siggaard-Andersen O* (1995) Oxygen status algorithm, version 3, with some applications. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 107: 13–20.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1995.tb04324.x>
17. *Kosenko E, Tikhonova L, Alilova G, Montoliu C* (2023) Erythrocytes Functionality in SARS-CoV-2 Infection: Potential Link with Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 24(6): 1–24.
<https://doi.org/10.3390/ijms24065739>
18. *Balcerek B, Steinach M, Lichti J, Maggioni MA, Becker PN, Labes R, Gunga HC, Persson PB, Fählning M* (2020) A broad diversity in oxygen affinity to haemoglobin. *Sci Rep* 10(1): 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73560-9>
19. *Samaja M, Crespi T, Guazzi M, Vandegriff KD* (2003) Oxygen transport in blood at high altitude: role of the hemoglobin-oxygen affinity and impact of the phenomena related to hemoglobin allosterism and red cell function. *Eur J Appl Physiol* 90(3-4): 351–359.
<https://doi.org/10.1007/s00421-003-0954-8>
20. *Сережина ЕК, Обрезан АГ* (2020) Патофизиологические механизмы и нозологические формы сердечно-сосудистой патологии при COVID-19. *Кардиология* 60(8): 23–26. [Serezhina EK, Obrezan AG (2020) Cardiovascular pathology in patients with COVID-19. *Kardiologiya* 60(8): 23–26. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18087/cardio.2020.8.n1215>
21. *Бойцов СА, Погосова НВ, Палеев ФН, Ежов МВ, Комаров АЛ, Певзнер ДВ, Груздев КА, Баринаева ИВ, Суворов АЮ, Алексеева ИА, Милько ОВ* (2021) Клиническая картина и факторы, ассоциированные с неблагоприятными исходами у госпитализированных пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. *Кардиология* 61(2): 4–14. [Boytsov SA, Pogosova NV, Paleev FN, Ezhov MV, Komarov AL, Pevsner DV, Gruzdev KA, Barinova IV, Suvorov AYU, Alekseeva IA, Milko OV (2021) Clinical characteristics and factors associated with poor outcomes in hospitalized patients with novel coronavirus infection COVID-19. *Kardiologiya* 61(2): 4–14. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18087/cardio.2021.2.n1532>

22. *Nechipurenko YD, Semyonov DA, Lavrinenko IA, Lagutkin DA, Generalov EA, Zaitceva AY, Matveeva OV, Yegorov YE* (2021) The Role of Acidosis in the Pathogenesis of Severe Forms of COVID-19. *Biology* (Basel) 10(9): 1–15.
<https://doi.org/10.3390/biology10090852>
23. *Busana M, Camporota L, Gattinoni L* (2022) Hypoxaemia in COVID-19: many pieces to a complex puzzle. *Eur Respir Rev* 31(164): 1–2.
<https://doi.org/10.1183/16000617.0090-2022>
24. *Serebrovska ZO, Chong EY, Serebrovska TV, Tumanovska LV, Xi L* (2020) Hypoxia, HIF-1 α , and COVID-19: from pathogenic factors to potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin* 41(12): 1539–1546.
<https://doi.org/10.1038/s41401-020-00554-8>
25. *Dhont S, Derom E, Van Braeckel E, Depuydt P, Lambrecht BN* (2020) The pathophysiology of 'happy' hypoxemia in COVID-19. *Respir Res* 21(1): 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12931-020-01462-5>
26. *Ebihara A, Kitahara A, Iwamoto T, Kuwahira I* (2022) Silent Hypoxemia in COVID-19 Pneumonia. *Adv Exp Med Biol* 1395: 117–122.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-14190-4_20
27. *Тухомирова ИА* (2023) Реология крови и микроциркуляция. Усп физиол наук 54(1): 3–25. [*Tikhomirova IA* (2023) Blood rheology and microcirculation. *Usp fiziol nauk* 54(1): 3–25. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179823010071>
28. *Marques O, Weiss G, Muckenthaler MU* (2022) The role of iron in chronic inflammatory diseases: from mechanisms to treatment options in anemia of inflammation. *Blood* 140(19): 2011–2023.
<https://doi.org/10.1182/blood.202101347235994752>
29. *Ganz T* (2019) Anemia of Inflammation. *N Engl J Med* 381(12): 1148–1157.
<https://doi.org/10.1056/NEJMr180428131532961>
30. *Nemeth E, Ganz T* (2023) Hcpidin and Iron in Health and Disease. *Annu Rev Med* 74: 261–277.
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-043021-032816>
31. *Thomas T, Stefanoni D, Dzieciatkowska M, Issaian A, Nemkov T, Hill RC, Francis RO, Hudson KE, Buehler PW, Zimring JC, Hod EA, Hansen KC, Spitalnik SL, D'Alessandro A* (2020) Evidence of Structural Protein Damage and Membrane Lipid Remodeling in Red Blood Cells from COVID-19 Patients. *J Proteom Res* 19(11): 4455–4469.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00606>
32. *Gille T, Sesé L, Aubourg E, Fabre EE, Cymbalista F, Ratnam KC, Valeyre D, Nunes H, Richalet JP, Planès C* (2021) The Affinity of Hemoglobin for Oxygen Is Not Altered During COVID-19. *Front Physiol* 12: 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.578708>
33. *Донина ЖА* (2022) Причины гипоксемии при COVID-19. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 108 (1): 3–12. [*Donina ZhA* (2022) Causes of hypoxemia in COVID-19. *Russ J Physiol* 108(1): 3–12. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813922010058>
34. *Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Onohuean H, El-Saber Batiha G* (2022) COVID-19 and erythrocrine function: The roller coaster and danger. *Int J Immunopathol Pharmacol* 36: 1–7.
<https://doi.org/10.1177/03946320221103151>
35. *Vogel DJ, Formenti F, Retter AJ, Vasques F, Camporota L* (2020) A left shift in the oxyhaemoglobin dissociation curve in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Br J Haematol* 191(3): 390–393.
<https://doi.org/10.1111/bjh.17128>
36. *Daniel Y, Hunt BJ, Retter A, Henderson K, Wilson S, Sharpe CC, Shattock MJ* (2020) Haemoglobin oxygen affinity in patients with severe COVID-19 infection. *Br J Haematol* 190(3): 126–127.
<https://doi.org/10.1111/bjh.16888>
37. *DeMartino AW, Rose JJ, Amdahl MB, Dent MR, Shah FA, Bain W, McVerry BJ, Kitsios GD, Tejero J, Gladwin MT* (2020) No evidence of hemoglobin damage by SARS-CoV-2 infection. *Haematologica* 105: 2769–2773.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2020.264267>
38. *Ceruti S, Minotti B, Glotta A, Biggiogero M, Bona G, Marzano M, Greco P, Spagnoletti M, Garzoni C, Bendjelid K* (2022) Temporal changes in the oxyhemoglobin dissociation curve of critically ill COVID-19 patients. *J Clin Med* 11(3): 1–14.
<https://doi.org/10.3390/jcm11030788>
39. *Renoux C, Fort R, Nader E, Boisson C, Joly P, Stauffer E, Robert M, Girard S, Cibiel A, Gauthier A, Connes P* (2021) Impact of COVID-19 on red blood cell rheology. *Br J Haematol* 192(4): e108–e111.
<https://doi.org/10.1111/bjh.17306>

40. Bergamaschi G, Barteselli C, Del Rio V, Borrelli de Andreis F, Pellegrino I, Mengoli C, Miceli E, Colaneri M, Zuccaro V, Di Stefano M, Bruno R, Di Sabatino A (2023) Impaired respiratory function reduces haemoglobin oxygen affinity in COVID-19. *Br J Haematol* 200(5): e44–e47. <https://doi.org/10.1111/bjh>
41. Valle A, Rodriguez J, Camiña F, Rodríguez-Segade M (2022) The oxyhaemoglobin dissociation curve is generally left-shifted in COVID-19 patients at admission to hospital, and this is associated with lower mortality. *Br J Haematol* 199(3): 332–338. <https://doi.org/10.1111/bjh.18431>
42. Сабиров ИС, Мамедова КМ, Султанова МС, Кожоева МЗ, Ибадуллаев БМ (2021) Роль и значение гипоксического компонента в развитии осложнений новой коронавирусной инфекции (COVID-19). *Науч насл* 62-2(62): 21–28. [Sabirov I, Mamedova K, Sultanova M, Kozhoeva M, Ibadullaev B (2021) The role and significance of the hypoxic component in the development of complications of the new coronavirus infection (COVID-19). *Sci Herit* 62-2(62): 21–28. (In Russ)]. <https://doi.org/10.24412/9215-0365-2021-62-2-21-28>
43. Hlutkina N, Zinchuk V (2022) Hemoglobin-oxygen affinity and gaseous transmitters (nitric oxide, hydrogen sulfide) in patients with COVID-19. *Ann Clin Case Rep* 7: 1–5.
44. Зинчук ВВ, Глуткина НВ (2013) Кислородсвязывающая способность гемоглобина и оксида азота. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 99(5): 537–554. [Zinchuk VV, Glutkina NV (2013) Oxygen-binding capacities of hemoglobin and nitric oxide. *Russ J Physiol* 99(5): 537–554. (In Russ)].
45. Zinchuk V, Biletskaya E (2023) Effect of ozone on oxygen transport and pro-oxidant-antioxidant balance of red blood cell suspension. *Acta Chim Slov* 70(2): 226–230. <https://doi.org/10.17344/acsi.2023.8032>
46. Зинчук ВВ (2021) Кислородтранспортная функция крови и газотрансмиттер сероводорода. *Усп физиол наук* 52(3): 41–55. [Zinchuk VV (2021) Oxygen transport functions of blood and hydrogen sulfide gazotransmitter. *Usp fiziol nauk* 52(3): 41–55. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0301179821030085>
47. Драпкина ОМ, Васильева ЛЭ (2020) Спорные вопросы применения ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента и антагонистов рецепторов ангиотензина у пациентов с COVID-19. *Кардиоваск терапия и профилактика* 19(3): 2580. [Drapkina OM, Vasilyeva LE (2020) Debatable points of using angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists in patients with COVID-19. *Cardiovasc Therapy and Prevent* 19(3): 2580. (In Russ)]. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2020-2580>
48. Петрищев НН, Халепов ОВ, Вавиленкова ЮА, Власов ТД (2020) COVID-19 и сосудистые нарушения (обзор литературы). *Регион кровооб и микроцирк* 19(3): 90–98. [Petrishchev NN, Khalepo OV, Vavilenkova YuA, Vlasov TD (2020) COVID-19 and vascular disorders (literature review). *Region Blood Circulat and Microcirc* 19(3): 90–98. (In Russ)]. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2020-19-3-90-98>
49. Liddle L, Monaghan C, Burleigh MC, Baczynska KA, Muggeridge DJ, Easton C (2022) Reduced nitric oxide synthesis in winter: A potential contributing factor to increased cardiovascular risk. *Nitric Oxide* 127: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2022.06.007>
50. Mandal SM (2023) Nitric oxide mediated hypoxia dynamics in COVID-19. *Nitric Oxide* 133: 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2023.02.002>
51. Zinchuk V, Zhadko D (2019) Association of endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism with blood oxygen transport. *Nitric Oxide* 84: 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.01.007>
52. Mortaz E, Malkmohammad M, Jamaati H, Naghan PA, Hashemian SM, Tabarsi P, Varahram M, Zaheri H, Chousein EGU, Folkerts G, Adcock IM (2020) Silent hypoxia: higher NO in red blood cells of COVID-19 patients. *BMC Pulm Med* 20(1): 269–272. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-01310-8>
53. Lior Y, Yatzkan N, Bрами I, Yogev Y, Riff R, Hekselman I, Fremder M, Freixo-Lima G, Be'er M, Amirav I, Lavie M (2022) Fractional exhaled Nitric Oxide (FeNO) level as a predictor of COVID-19 disease severity. *Nitric Oxide* 124: 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2022.05.002>
54. Kolluru GK, Prasai PK, Kaskas AM, Letchuman V, Pattillo CB (2016) Oxygen tension, H₂S, and NO bioavailability: is there an interaction? *J Appl Physiol* 120(2): 263–270. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00365.2015>
55. Ивашкин ВТ, Драпкина ОМ (2011) Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. 2-е изд. Гэотар-Медиа. [Ivashkin VT, Drapkina OM (2011) Clinical significance of nitric oxide and heat shock proteins. 2nd ed. Geotar Media. (In Russ)].
56. Wang G, Huang Y, Zhang N, Liu W, Wang C, Zhu X, Ni X (2021) Hydrogen Sulfide Is a Regulator of Hemoglobin Oxygen-Carrying Capacity via Controlling 2,3-BPG Production in Erythro-

- cytes. *Oxid Med Cell Longev* 2021: 1–16.
<https://doi.org/10.1155/2021/8877691>
57. *Olson KR* (2008) Hydrogen sulfide and oxygen sensing: implications in cardiorespiratory control. *J Exp Biol* 211(17): 2727–2734.
<https://doi.org/10.1242/jeb.010066>
 58. *Birulina YG, Ivanov VV, Buyko EE, Gabitova IO, Kovalev IV, Nosarev AV, Smaglyi LV, Gusakova SV* (2021) Role of H₂S in regulation of vascular tone in metabolic disorders. *Bull Exp Biol Med* 171(4): 436–440.
<https://doi.org/10.1007/s10517-021-05243-y>
 59. *Fadyukova OE, Koshelev VB* (2020) The effect of hydrogen sulfide on the rat erythrocyte deformability. *Bull Exp Biol Med* 169(6): 725–728.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04965-9>
 60. *Зинчук ВВ, Глуткина НВ, Кулага ЕЯ* (2022) Газотрансмиттеры (NO, H₂S) и механизмы транспорта кислорода кровью у пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19. *Смоленск мед альм* 2: 79–81. [*Zinchuk VV, Glutkina NV, Kulaga EI* (2022) Gasotransmitters (NO, H₂S) and mechanisms of oxygen transport in blood in patients with coronavirus infection COVID-19. *Smol Med Alm* 2: 79–81. (In Russ)].
<https://doi.org/10.37903/SMA.2022.2.16>

Hemoglobin Affinity to Oxygen during Coronavirus Infection: New Faces of a Known Problem

V. V. Zinchuk^{a, *} and N. V. Hlutkina^a

^a*Grodna State Medical University, Grodna, Belarus*

^{*}*e-mail: zinchuk@grsmu.by*

The development of coronavirus infection prevents the transport of oxygen to the tissues through the mechanism of impaired hemoglobin saturation in the damaged lung. The change in the affinity of hemoglobin for oxygen, which is the most important factor in compensating for oxygen deficiency in various pathological conditions, underlies the processes of adaptation to hypoxia. The question of the significance of the shift in the oxyhemoglobin dissociation curve in this pathology is actively discussed, in which its shift to the left in the arterial blood and its shift to the right in the venous blood are noted, which in the conditions of the development of the hypoxic syndrome reflects the activation of the body's mechanisms to compensate for oxygen deficiency. The change in its position is not specific for this pathology, but is determined by the severity of oxygen deficiency and the imbalance of the mechanisms of the cardiorespiratory system, as well as the peculiarities of the status of patients and the analyzed blood sample.

Keywords: COVID-19, blood, oxygen, gaseous transmitter, nitrogen monoxide, hydrogen sulfide, hypoxia

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

НЕНЕЙРОНАЛЬНАЯ ГАМК
В НЕОКОРТИКАЛЬНЫХ НЕЙРОТРАНСПЛАНТАТАХ КРЫС

© 2023 г. З. Н. Журавлева^{1, *}, Г. И. Журавлев²

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

²Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

*E-mail: zina_zhur@mail.ru

Поступила в редакцию 21.06.2023 г.

После доработки 10.09.2023 г.

Принята к публикации 01.10.2023 г.

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) играет важную роль в регуляции развития и функционирования мозга. Целью работы было исследование участия ГАМК, содержащейся в ненейрональных клетках, в дифференцировке и созревании неокортикальных трансплантатов крыс. Трансплантировали кусочки фетального соматосенсорного неокортекса в острую полость гомотопической области коры взрослых крыс-самцов. Через 4 мес. после операции проводили гистологическое и электронно-микроскопическое изучение трансплантатов. Трансплантаты были хорошо васкуляризованы и состояли из нейрональных и глиальных клеток. Локализацию ГАМК в ненейрональных клетках исследовали с помощью ультраструктурной иммуноцитохимии с использованием антител, конъюгированных с коллоидным золотом. Наибольшая экспрессия иммунометки в виде электронно-плотных глобул размером от 20 до 60–80 нм была обнаружена в протоплазматических астроцитах и их отростках. Астроцитарные концевые ножки вокруг капилляров также содержали ГАМК-позитивные гранулы. Кроме того, ГАМК-положительные гранулы наблюдались в некоторых миелообразующих клетках и в эндотелиальной стенке кровеносных сосудов. Полученные результаты показали, что в неокортикальных нейротрансплантатах ГАМК-ергическая сигнализация посредством ненейрональных клеток участвует в морфофункциональной дифференцировке трансплантированной ткани.

Ключевые слова: неокортикальные аллотрансплантаты, дифференцировка, гамма-аминомасляная кислота, ультраструктурная иммуноцитохимия, ненейрональные клетки, астроциты, эндотелиальные клетки

DOI: 10.31857/S0869813923120166, EDN: CGWKWZ

ВВЕДЕНИЕ

Мозг млекопитающих обладает очень низкой способностью для регенерации при травмах и нейродегенеративных заболеваниях. Нейротрансплантация является одним из способов, способствующих морфофункциональному восстановлению нервной системы. В экспериментальных работах показано, что пересаженные эмбриональные клетки или кусочки незрелой ткани успешно приживаются, продолжают дифференцировку и участвуют в восстановлении поврежденных нервных сетей головного мозга. Современное состояние исследований и перспектив клинического применения нейротрансплантации фетальных и стволовых клеток обобщено в ряде обзоров [1–6]. Однако даже в долгоживущих нейротрансплантатах сохраня-

ются морфологические показатели неполного созревания некоторых глиоцитов и нейрональных отростков [7, 8]. Обнаружена также задержка экспрессии маркерного белка зрелых нейронов NeuN и пролонгированная пролиферация трансплантированных клеток [9]. Кроме того, недостаточно изучены особенности нейромедиаторной дифференцировки в такой сложной морфофункциональной системе как нейротрансплантат, когда эмбриональная ткань функционирует в необычном для нее гуморальном и тканевом микроокружении зрелого мозга. Так, при иммунохимическом исследовании гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) мы ранее обнаружили значительно меньше ГАМК-содержащих нейронов в неокортикальных трансплантатах по сравнению с соседней интактной областью мозга [10]. Указанные выше аномалии дифференцировки трансплантированной ткани и недостаток ГАМК-ергического синаптического торможения могут приводить к функциональным патологиям и формированию эпилептических очагов в мозге [11].

В условиях естественного онтогенеза ГАМК играет ведущую роль в развитии ЦНС. Она первой из нейромедиаторов появляется в мозге и, деполяризуя клетки-предшественники, управляет их пролиферацией и миграцией, а также созреванием новорожденных нейронов. Когда синаптическая передача еще отсутствует, большинство эффектов ГАМК опосредуются по аутокринному или паракринному механизму. В зрелом мозге ГАМК оказывает гиперполяризующий эффект на нейроны и является основным тормозным медиатором [12–14]. В качестве нейромедиатора ГАМК освобождается из нервных окончаний интернейронов и действует на постсинаптические рецепторы. В то же время современные данные показывают, что ГАМК содержится не только в нейронах, но и в глиальных клетках, и количество ее в астроцитах возрастает в патологических ситуациях [13–16]. Традиционно ГАМК, содержащуюся в ненейрональных клетках, относят к метаболическому пулу, а не к нейротрансмиттерному пулу. В мозге имеется два пула ГАМК, которые синтезируются разными изоформами глутаматдекарбоксилазы (ГДК). ГАМК, синтезированная ГДК-65, рассматривается как синаптический пул и ассоциируется с экзоцитозом нейромедиатора из синаптических везикул, а ГАМК, синтезированная ГДК-67, имеет отношение к метаболическому пулу и локализуется в цитоплазме [17, 18].

Учитывая данные о важной морфогенной роли ГАМК в эмбриогенезе мозга млекопитающих и о нарушении нейрохимической дифференцировки тормозных ГАМКергических нейронов в условиях трансплантации, целью настоящей работы было изучение степени участия ненейрональной ГАМК в развитии и функционировании интрамозговых трансплантатов. Для этого было проведено ультраструктурное иммуноцитохимическое исследование ГАМК, содержащейся в ненейрональных клетках неокортикальных трансплантатов, развивающихся в соматосенсорной области мозга крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для интранеокортикальной трансплантации использовали лабораторных крыс породы Вистар, содержащихся в обычных условиях вивария. Все процедуры с животными проводили под общим нембуталовым наркозом (30–40 мг/кг, внутривенно); использованные в работе реактивы и антитела были производства Sigma-Aldrich. В качестве донорского материала для трансплантации служили кусочки эмбрионального мозга из неокортекса 17-дневных плодов. Выделение закладки соматосенсорной области производили под бинокулярной лупой на основании предварительного сравнения гистологических препаратов эмбрионов разного возраста, новорожденных крыс и стереотаксических координат взрослых животных. Для

этого делали продольные разрезы на расстоянии 1 мм от средней линии полушария и по самой латеральной части неокортекса, затем поперечным разрезом отсекали фрагмент 1.0–1.5 мм на уровне нижележащей закладки подкоркового септального ядра. Гомотопическую аллотрансплантацию производили в острую полость соматосенсорной области коры взрослых крыс-самцов массой 200–250 г ($n = 5$) в соответствии со стереотаксическими координатами ($AP = +2.0$; $L = 5.5$). Трансплантаты развивались в течение 4 мес., что соответствует срокам достижения тканью *in situ* взрослого дифференцированного состояния. После этого животных транскардиально перфузировали фиксатором, состоящим из 2.5%-ного раствора формальдегида и 1.0%-ного раствора глутарового альдегида в 0.1М фосфатном буфере при pH 7.4. Затем выделяли область мозга, содержащую нейротрансплантат, промывали в том же буфере и готовили коронарные срезы толщиной 50 мкм на вибротоме (World Precision Instruments). Часть срезов окрашивали крезилвиолетом по Нисслю для рутинного гистологического изучения нейротрансплантатов.

Выявление ГАМК производили на вибротомных тканевых срезах толщиной 50 мкм с их последующей дофиксацией и обработкой для электронной микроскопии, несколько модифицируя ранее описанные протоколы [19]. Сначала срезы погружали в блокирующий раствор 10%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА) в трис-HCl буфере на 30 мин при комнатной температуре. Затем инкубировали в первичных кроличьих антителах к ГАМК (номер A 2052 по каталогу Sigma — Aldrich), разведенных (1 : 1000) в 10%-ном БСА/трис буфере (1 день, во влажной камере, в холодильнике). После нескольких промывок в 1.0%-ном БСА/трис буфере срезы инкубировали во вторичных антикроличьих антителах, конъюгированных с коллоидным золотом (каталожный номер G 7402 Sigma — Aldrich), при разведении 1 : 100 в течение 4 ч при комнатной температуре. Для выявления реакционного продукта использовали авидин-биотин-пероксидазный комплекс и 0.05%-ный раствор 3,3'-диаминобензидина в 0.1М фосфатном буфере. Контрольные образцы обрабатывали теми же реагентами за исключением инкубации в растворе антител против ГАМК. Для ультраструктурного изучения материал дофиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия, промывали, обезвоживали в серии спиртов восходящей крепости и ацетоне и заливали в эпоксидную смолу Эпон 812. Ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали в электронном микроскопе JEOL JEM-100B (Япония). Корректировку яркости и контраста полученных фотонегативов, а также удаление неспецифического фонового окрашивания производили с помощью компьютерной программы Adobe Photoshop.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Визуальный анализ мозга взрослых реципиентов через 4 мес. после аллотрансплантации фрагментов эмбрионального соматосенсорного неокортекса показал наличие трансплантатов у всех пяти экспериментальных животных. Хорошо васкуляризованная трансплантированная ткань полностью заполняла операционную ямку и иногда несколько выступала над поверхностью мозга. Трансплантаты представляли собой клеточные образования, в которых нервные и глиальные клетки были распределены диффузно без какой-либо ориентации и не формировали сложную организацию, характерную для неокортекса. Однако в некоторых нейротрансплантатах выявлялась отчетливая тенденция к образованию небольших клеточных скоплений. На свето-микроскопическом уровне клетки имели все признаки полностью дифференцированных элементов. Нейроны отличались от глиоцитов более крупными размерами и обширной цитоплазмой, содержащей глыбки нисслевско-

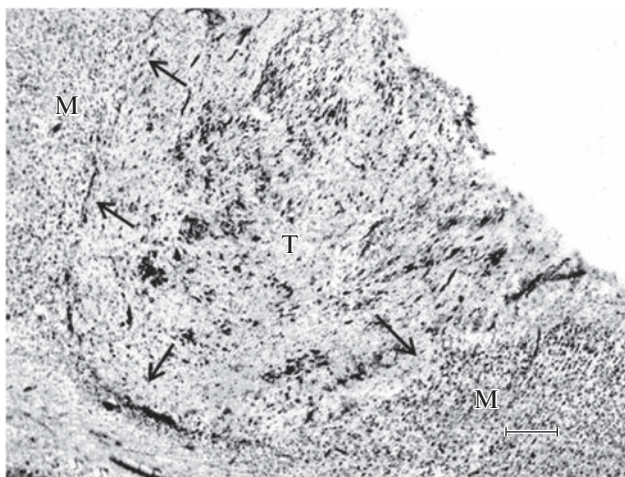


Рис. 1. Общий гистологический вид неокортикального трансплантата (4 месяца после операции) в соматосенсорной области неокортекса реципиента. Граница между трансплантатом (Т) и мозгом (М) обозначена стрелками. Окраска крезилвиолетом по Ниссля. Масштаб: 100 мкм.

го вещества. На гистологических срезах четко распознавались ткани, принадлежащие неокортексу реципиента и неокортикальному трансплантату (рис. 1).

Между трансплантатом и мозгом реципиента прослеживалась отчетливая граница, но в отдельных участках можно было наблюдать полное слияние тканей. Чаше граница формировалась скоплением глиальных клеток, однако иногда в интерфазу проникали крупные кровеносные сосуды из мозговых оболочек. В таких областях скапливались клеточные элементы соединительной ткани, которые никогда не обнаруживались внутри паренхимы нейротрансплантатов. Таким образом, общий морфологический контроль, проведенный в настоящей работе, подтвердил ранее известные данные о хорошей приживаемости трансплантированной ткани, дальнейшей дифференцировке эмбриональных клеточных элементов и приобретении ими типичных для зрелого мозга цитологических форм [3–5, 7].

Электронно-микроскопический анализ трансплантатов после иммуноцитохимической обработки показал, что условия проведения реакции на ГАМК существенно не отразились на сохранности ультраструктуры. В них наблюдали характерное для мозговой ткани соотношение нервных и глиальных клеток, организованный нейропил и разные типы синаптических контактов. По интенсивности иммуномечения на ГАМК среди ненейрональных клеток выделялись протоплазматические астроциты, которые особенно активно взаимодействовали с антителами. Такие астроциты имели крупное ядро, малое количество органелл в цитоплазме и практически не содержали микрофиламентов. Иммунометка в виде отдельных электронно-плотных глобул размером от 20 до 60–80 нм была распределена по цитоплазме астроцитов без выраженной пространственной закономерности и привязки к мембранам. В то же время скопления до 10 и более позитивных гранул наблюдались над некоторыми митохондриями. Астроцитарные ядра были, как правило, иммунонегативны (рис. 2).

В нейропиле трансплантатов, состоящем из переплетения отростков нейрональных и глиальных клеток, многие перерезанные астроцитарные профили также были иммуномеченными (рис. 2, 3). Гранулы реакционного продукта в них имели хао-

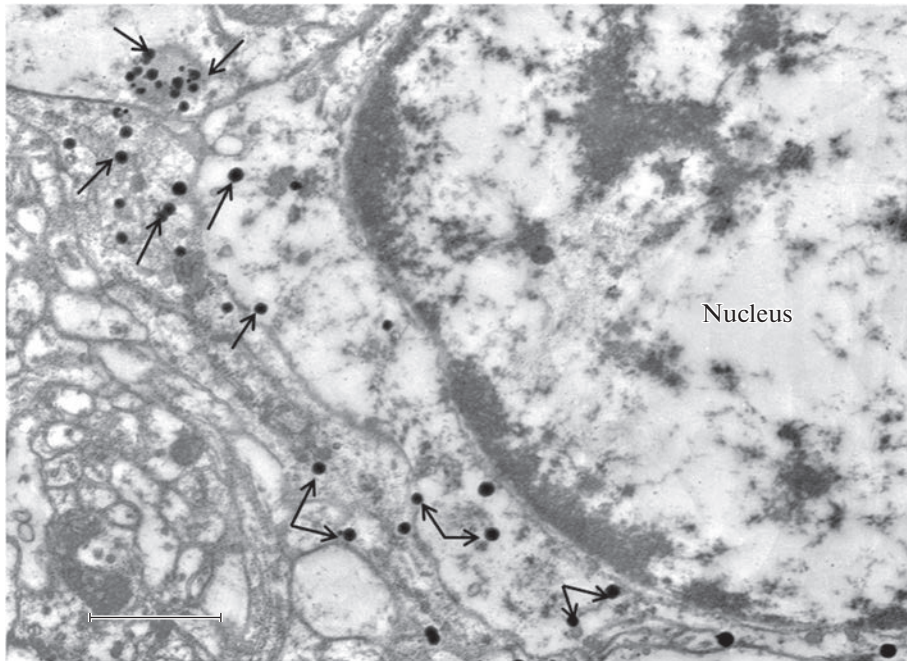


Рис. 2. Иммулокализация ГАМК в цитоплазме астроцита интранеокортикального трансплантата. Nucleus — ядро астроцита. Некоторые ГАМК-позитивные гранулы указаны стрелками. Масштаб: 1 мкм.

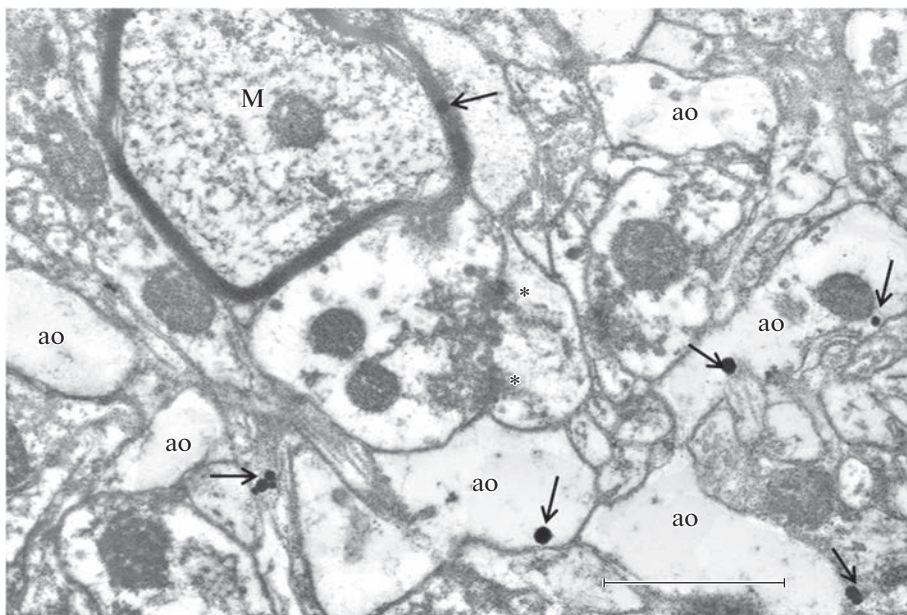


Рис. 3. Нейропил неокортикального трансплантата. М — миелинизированный аксон. Звездочками обозначены активные зоны возбуждающего синаптического контакта; ао — астроцитарные отростки (astrocytic outgrowth). Другие обозначения и масштаб как на рис. 2.

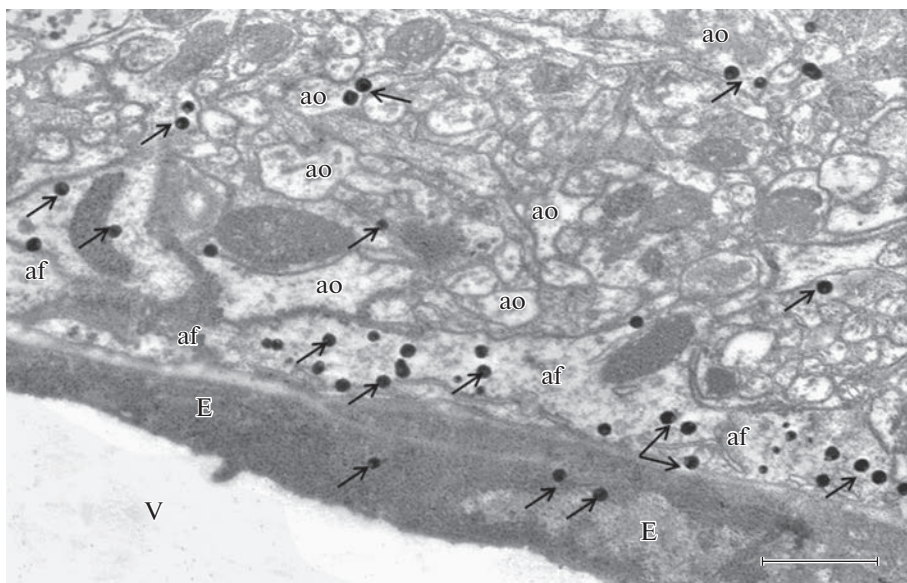


Рис. 4. Кровеносный капилляр в неокортикальном трансплантате. V — просвет сосуда; E — эндотелиальные клетки; af — перикапиллярные астроцитарные ножки (astrocytic foot), ao — астроцитарные отростки (astrocytic outgrowth). Другие обозначения и масштаб как на рис. 2 и 3.

тичное распределение, аналогичное тому, что в телах астроцитов. Перисинаптические астроцитарные отростки, расположенные около асимметричных возбуждающих синаптических контактов и представляющие один из компонентов трехчастных синапсов, также содержали редкие иммунопозитивные гранулы. Кроме того, продукт иммунореакции изредка наблюдали над профилями миелиновой оболочки аксонов (рис. 3). Следует отдельно отметить высокий уровень иммунореактивности в клеточной стенке кровеносных капилляров, что проявлялось не только в большом количестве ГАМК-положительных частиц в перикапиллярных астроцитарных концевых ножках, но и в достаточно выраженной экспрессии иммунометки в эндотелиальных клетках (рис. 4).

Накопление ГАМК в астроцитах и других ненейрональных клетках может происходить разными путями. Какое-то количество аминокислоты поступает за счет излишков нейромедиатора из тормозных синаптических окончаний с помощью специальных мембранных транспортеров [20]. Однако есть данные, что цитоплазматическая ГАМК быстро метаболизируется трансаминазой и одного обратного захвата окружающей аминокислоты недостаточно. Большая часть ГАМК в астроцитах синтезируется посредством декарбоксилирования глутамата, но не поглощением из экстраклеточного пространства. Наши ультраструктурные наблюдения иммунопозитивных гранул в астроцитах и их отростках вблизи возбуждающих глутаматергических (а не тормозных) синапсов свидетельствуют о существовании такого способа синтеза ГАМК в нейротрансплантатах. Кроме того, скопления ГАМК-содержащих глобул над митохондриями позволяют предположить, что в астроцитах неокортикальных трансплантатов реализуется дополнительный способ выработки ГАМК путем деградации путресцина митохондрий. Такой путь синтеза был обнаружен на ранних стадиях дифференцировки нейробластов, в которых активность ГДК, которая синтезирует ГАМК, не определялась [21]. Механизм синтеза

ГАМК из путресцина был также найден в астроцитах взрослых животных при моделировании болезни Альцгеймера и височной эпилепсии [16, 22]. На основании представленных данных литературы можно предположить, что дополнительный путь синтеза метаболитического пула ГАМК из путресцина также участвует в процессе формирования нейрональных связей в нейротрансплантатах.

В изученных нами нейротрансплантатах астроцитарная ГАМК, по-видимому, необходима также для поддержания баланса между возбуждением и торможением. Основанием для такого предположения являются данные о гипервозбудимости нейронов, легкой провокации эпилептиформной активности и о сниженном количестве ГАМК-ергических нейронов в аналогичных нейротрансплантатах [10, 23, 24]. Показано, что астроцитарная ГАМК действует через внесинаптические метаболитические рецепторы, генерирует тоническое торможение и обеспечивает противосудорожный механизм при височной эпилепсии и других неврологических расстройствах [16, 22, 25]. Вместе с тем в патологических ситуациях накопление астроцитарной ГАМК сочетается с гипертрофией глиоцитов и содержанием в них глиального фибриллярного кислого белка GFAP [25, 26]. В нейротрансплантатах ГАМК-содержащие астроциты не имели морфологических признаков реактивного состояния. В связи с этим мы полагаем, что роль астроцитарной ГАМК в условиях нейротрансплантации заключается не только в регулировании дифференцировки трансплантированных клеток и их адаптации к среде зрелого организма, но и в защите нейронов от гипервозбуждения.

Обнаружение в настоящей работе иммунореактивности в миелиновой оболочке некоторых аксонов, по-видимому, связано с продолжающейся дифференцировкой трансплантированных нейронов, миелинизацией аксонов и установлением нервных связей. Хотя в данной работе гистологическое исследование не выявило признаков неполной зрелости клеточных элементов в 4-месячных неокортикальных трансплантатах, ранее на ультраструктурном уровне мы отмечали наличие таких свидетельств даже в более поздний постоперационный период. В частности, в нейротрансплантатах были обнаружены конусы роста аксонов и дендритов, а также незрелые формы олигодендроглии [7, 8]. Существуют данные, что только незрелые олигодендроциты активно экспрессируют метаболитические рецепторы и обладают высокой чувствительностью к ГАМК [27]. Присутствие ГАМК в миелиновой оболочке можно также объяснить исследованиями, проведенными на зрелой нервной системе, в которых показано, что несинаптические сигнальные пути ГАМК участвуют в процессах узнавания аксонов и их миелинизации, способствуя тем самым репаративному восстановлению после повреждения [14, 15, 28]. По-видимому, в исследованных нами нейротрансплантатах также продолжается процесс реорганизации функциональных связей. Параллельно идущие регенеративно-дегенеративные процессы в синаптических окончаниях мы ранее наблюдали в интракортикальных трансплантатах гиппокамповой формации [7].

Представляют интерес полученные нами на неокортикальных нейротрансплантатах данные об иммунохимическом выявлении ГАМК в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров. Помимо классической роли сосудистой сети для доставки кислорода и метаболитов, необходимых нервным и глиальным клеткам, сосуды являются мощными сигнальными системами, которые контролируют различные клеточные процессы во время развития. ГАМК, действуя на соседние клетки несинаптическим, паракринным способом, выполняет функцию нейротрофического фактора, регулирует ангиогенез и способствует формированию плотных контактов ГЭБ [29, 30]. Авторы показали, что недостаток сигнализации посредством эндотелиальной ГАМК в эмбриогенезе приводит к нарушениям постнатального развития, неправильной миграции нейрональных предшественников и нейропсихическим заболева-

ниям в будущем. Присутствие ГАМК в эндотелии и астроцитарных концевых ножках капиллярной стенки свидетельствует об участии метаболической формы этой аминокислоты в организации астроцитарно-васкулярных клеточных комплексов в нейротрансплантатах. Известно, что зона интерфейса между кровеносными капиллярами и нервными элементами является функционально важным клеточным компартментом для поддержания гомеостаза ЦНС как в норме, так и при патологии [31, 32].

Таким образом, проведенное иммуноцитохимическое исследование неокортикальных нейротрансплантатов показало высокую экспрессию ГАМК в ненейрональных клетках, выполняющих разные функции. Наибольшая выраженность иммунометки в протоплазматических астроцитах свидетельствует о важности метаболического пула ГАМК не только как нейротрофического фактора, но и как молекулярного субстрата для установления тонических тормозных процессов в нейротрансплантатах. Накопление ГАМК в эндотелиальных клетках и в миелиновой оболочке является дополнительным признаком пролонгированного развития трансплантированной ткани и процесса формирования аксональных связей. В то же время, следует отметить, что в полностью дифференцированном неокортексе зрелых животных (в том числе, и в соматосенсорной области) также присутствуют ГАМК-ергические астроциты, число которых возрастает при травме и в патологических ситуациях [33, 34].

Полученные результаты и данные литературы позволяют предположить, что в интранеокортикальных нейротрансплантатах, как и при естественном развитии мозга, метаболический пул ГАМК, содержащийся в ненейрональных клетках, участвует в дифференцировке и созревании фетальной нервной ткани и в сохранении тормозно-возбуждающего баланса в нейронных сетях.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, протокол № 7/2022 от 5 марта 2022 г.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН № 075-00381-21-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование работы (З.Н.Ж.), проведение операций по трансплантации и постоперационный уход за животными (Г.И.Ж.), обработка материала для электронной микрокопии (Г.И.Ж.), микроскопические исследования, проведение иммуноцитохимической реакции (З.Н.Ж.), написание и редактирование манускрипта (З.Н.Ж., Г.И.Ж.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Электронно-микроскопические исследования выполнены на оборудовании ЦКП ПНЦБИ РАН (№ 670266).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cendelin J, Mitoma H* (2018) Neurotransplantation therapy. *Handb Clin Neurol* 155: 379–391. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64189-2.00025-1>
2. *Mitoma H, Manto M, Gandini J* (2019) Recent advances in the treatment of cerebellar disorders. *Brain Sci* 10(1): 11. <https://doi.org/10.3390/brainsci10010011>
3. *Gong Z, Xia K, Xu A, Yu C, Wang C, Zhu J, Huang X, Chen Q, Li F, Liang C* (2020) Stem cell transplantation: A promising therapy for spinal cord injury. *Curr Stem Cell Res Ther* 15(4): 321–331. <https://doi.org/10.2174/1574888X14666190823144424>
4. *Namestnikova DD, Cherkashova EA, Sukhinich KK, Gubskiy IL, Leonov GE, Gubsky LV, Majouga AG, Yarygin KN* (2020) Combined cell therapy in the treatment of neurological disorders. *Biomedicines* 8: 613. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120613>
5. *Björklund A, Parmar M* (2021) Dopamine cell therapy: From cell replacement to circuitry repair. *J Parkinsons Dis* 11(2): 159–165. <https://doi.org/10.3233/JPD-212609>
6. *Li J-Y, Li W* (2021) Postmortem studies of fetal grafts in Parkinson’s disease: What lessons have we learned? *Front Cell Dev Biol* 9: 666675. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.666675>
7. *Zhuravleva ZN* (2005) The hippocampus and neurotransplantation. *Neurosci Behav Physiol* 35(4): 343–354. <https://doi.org/10.1007/s11055-005-0031-3>
8. *Zhuravleva ZN, Khutsian SS* (2014) Structural signs of dynamic state of synaptic contacts between neurotransplant and brain. *Bull Exp Biol Med* 156(4): 448–451. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2371-x>
9. *Sukhinich KK, Podgornyi OV, Aleksandrova MA* (2011) Immunohistochemical analysis of development of suspension and tissue neurotransplants. *Biol Bull*: 563. <https://doi.org/10.1134/S1062359011060136>
10. *Bragin A, Takács J, Vinogradova O, Zhuravleva Z, Hámori J* (1991) Number of GABA-immunopositive and GABA-immunonegative neurons in various types of neocortical transplants. *Exp Brain Res* 85(1): 114–128. <https://doi.org/10.1007/BF00229992>
11. *Buckmaster PS, Abrams E, Wen X* (2017) Seizure frequency correlates with loss of dentate gyrus GABAergic neurons in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 525(11): 2592–2610. <https://doi.org/10.1002/cne24226>
12. *Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E* (2012) The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist* 18(5): 467–486. <https://doi.org/10.1177/1073858412438697>
13. *Kilb W, Kirischuk S, Luhmann HJ* (2013) Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. *Front Neural Circuits* 7: 139. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00139>
14. *Bolneo E, Chau PYS, Noakes PG, Bellingham MC* (2022) Investigating the role of GABA in neural development and disease using mice lacking GAD67 or VGAT genes. *Int J Mol Sci* 23(14): 7965. <https://doi.org/10.3390/ijms23147965>
15. *Bai X, Kirchhoff F, Scheller A* (2021) Oligodendroglial GABAergic signaling: More than inhibition. *Neurosci Bull* 37(7): 1039–1050. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00693-w>
16. *Müller J, Timmermann A, Henning L, Müller H, Steinhauser C, Bedner P* (2020) Astrocytic GABA accumulation in experimental temporal lobe epilepsy. *Front Neurol* 11 (Article 61). <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.614923>
17. *Obata K, Hirano M, Kume N, Kawaguchi Y, Itohara S, Yanagawa Y* (2008) GABA and synaptic inhibition of mouse cerebellum lacking glutamate decarboxylase 67. *Biochem Biophys Res Commun* 370(3): 429–433. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.110>
18. *Kajita Y, Mushiake H* (2021) Heterogeneous GAD65 expression in subtypes of GABAergic neurons across layers of the cerebral cortex and hippocampus. *Front Behav Neurosci* 15 (Article 750869). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.750869>

19. Ormel L, Lauritzen KH, Schreiber R, Kunzelmann K, Gundersen V (2020) GABA, but not bestrophin-1, is localized in astroglial processes in the mouse hippocampus and the cerebellum. *Front Mol Neurosci* 13: 135.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.0013>
20. Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonically active GABA(A) receptors: Modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27(5): 262–269.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.03.005>
21. Sequerra EB, Gardino P, Hedin-Pereira C, de Mello FG (2007) Putrescine as an important source of GABA in the postnatal rat subventricular zone. *Neuroscience* 146(2): 489–493.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.062>
22. Jo S, Yarishkin O, Hwang YJ, Chun YE, Park M, Woo DH, Bae JY, Kim T, Lee J, Chun H, Park HJ, Lee DY, Hong J, Kim HY, Oh S-J, Park SJ, Lee H, Yoon B-E, Kim YS, Jeong Y, Shim I, Bae YC, Cho J, Kowall NW, Ryu H, Hwang E, Kim D, Lee CJ (2014) GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 20(8): 886–896.
<https://doi.org/10.1038/nm.3639>
23. Bragin AG, Bohne A, Vinogradova OS (1988) Transplants of the embryonal rat somatosensory neocortex in the barrel field of the adult rat: responses of the grafted neurons to sensory stimulation. *Neuroscience* 25(3): 751–758.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90034-6)
24. Zhuravleva ZN, Hutsyan SS, Zhuravlev GI (2016) Phenotypic differentiation of neurons in intraocular transplants. *Russ J Develop Biol* 47(3): 147–153.
<https://doi.org/10.7868/S0475145016030083>
25. Heo JY, Nam MH, Yoon HH, Kim J, Hwang YJ, Won W, Woo DH, Lee JA, Park HJ, Jo S, Lee MJ, Kim S, Shim J-E, Jang D-R, Kim KI (2020) Aberrant tonic inhibition of dopaminergic neuronal activity causes motor symptoms in animal models of Parkinson's disease. *Curr Biol* 30: 276–291.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.079>
26. Pandit S, Neupane C, Woo J, Sharma R, Nam MH, Lee GS, Yi MH, Shin N, Kim DW, Cho H, Jeon BH, Kim H-W, Lee CJ, Park JB (2020) Bestrophin1-mediated tonic GABA release from reactive astrocytes prevents the development of seizure-prone network in kainate-injected hippocampi. *Glia* 68: 1065–1080.
<https://doi.org/10.1002/glia.23762>
27. Luyt K, Slade TP, Dorward JJ, Durant CF, Wu Y, Shigemoto R, Mundell S, Váradi A, Molnár E (2007) Developing oligodendrocytes express functional GABA(B) receptors that stimulate cell proliferation and migration. *J Neurochem* 100: 822–840.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04255.x>
28. Serrano-Regal MP, Luengas-Escuza I, Bayón-Cordero L, Ibarra-Aizpurua N, Alberdi E, Pérez-Samartín A, Matute C, Sánchez-Gómez MV (2020) Oligodendrocyte differentiation and myelination is potentiated via GABA. *Neuroscience* 439: 163–180.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.07.014>
29. Li S, Kumar TP, Joshee S, Kirschstein T, Subburaju S, Khalili JS, Kloepper J, Du C, Elkha A, Szabo G, Jain RK, Kohling R, Vasudevan A (2018) Endothelial cell-derived GABA signaling modulates neuronal migration and postnatal behavior. *Cell Res* 28(2): 221–248.
<https://doi.org/10.1038/cr.2017.135>
30. Choi YK, Vasudevan A (2019) Mechanistic insights into autocrine and paracrine roles of endothelial GABA signaling in the embryonic forebrain. *Sci Rep* 9(1): 16256.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52729-x>
31. Segarra M, Aburto MR, Hefendehl J, Acker-Palmer A (2019) Neurovascular interactions in the nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 35: 615–635.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125142>
32. Peguera B, Segarra M, Acker-Palmer A (2021) Neurovascular crosstalk coordinates the central nervous system development. *Curr Opin Neurobiol* 69: 202–213.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.04.005>
33. Kilb W, Kirischuk S (2022) GABA release from astrocytes in health and disease. *Int J Mol Sci* 23(24): 15859.
<https://doi.org/10.3390/ijms232415859>
34. Ueberbach T, Simacek CA, Tegeder I, Kirischuk S, Mittmann T (2023) Tonic activation of GABAB receptors via GAT-3 mediated GABA release reduces network activity in the developing somatosensory cortex in GAD-GFP mice. *Front Synaptic Neurosci* 15: 1198159.
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2023.1198159>

Non-Neuronal GABA in Neocortical Neurografts of the Rats**Z. N. Zhuravleva^{a, *} and G. I. Zhuravlev^b***^aInstitute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino, Moscow Region, Russia**^bInstitute of Cell Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino, Moscow Region, Russia***e-mail: zina_zhur@mail.ru*

Gamma aminobutyric acid (GABA) plays an important role in regulating the development and functioning of the brain. The aim of this work was to study the involvement of GABA contained in non-neuronal cells in the differentiation and maturation of rat neocortical grafts. Pieces of fetal somatosensory neocortex were transplanted into the acute cavity of the homotopic region of the cortex of adult male rats. 4 months after the operation, the histological and electron microscopic examinations of the grafts were performed. The grafts were well vascularized and consisted of neuronal and glial cells. The localization of GABA in non-neuronal cells was studied by an ultrastructural immunocytochemistry using antibodies conjugated with colloidal gold. The highest expression of immunolabels in the form of electron-dense globules ranging in size from 20 to 60–80 nm was found in protoplasmic astrocytes and their processes. The pericapillary astrocytic endfeet also contained GABA-positive granules. In addition, GABA-positive granules have been observed in some myelin-forming cells and in the endothelial wall of blood vessels. The results obtained showed that GABAergic signaling via non-neuronal cells is involved in the morphofunctional differentiation of the transplanted neocortical tissue.

Keywords: neocortical allografts, differentiation, GABA, ultrastructural immunocytochemistry, non-neuronal cells, astrocytes, endothelial cells

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛИКИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА С РЕЦЕПТОРОМ
КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ ПО ДАННЫМ
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

© 2023 г. Д. А. Белинская^{1, *}, Н. В. Гончаров^{1, 2}

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

²*НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека,
Ленинградская обл., г.п. Кузьмоловский, Россия*

**E-mail: d_belinskaya@mail.ru*

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 13.10.2023 г.

Принята к публикации 16.10.2023 г.

У больных сахарным диабетом (СД) накопление конечных продуктов гликирования (AGE — advanced glycation end products) ведет к воспалению и оксидативному стрессу посредством активации специфических рецепторов AGE (RAGE). Гликированный альбумин (gHSA) вносит существенный вклад в общий уровень AGE в организме и, как следствие, в патогенез диабета и сопутствующих заболеваний. Механизм взаимодействия gHSA с RAGE практически не изучен. Цель представленного исследования — методами молекулярного моделирования изучить связывание gHSA с RAGE, определить основные участки взаимодействия и структурные особенности сайтов гликирования, определяющие эффективность образования комплекса с RAGE. Методами молекулярного докинга и молекулярной динамики (МД) были сконструированы десять моделей gHSA, каждой модели соответствовал один модифицированный остаток лизина (карбоксиметил-лизин): Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys525, Lys573, Lys574. Методом макромолекулярного докинга построены комплексы gHSA с V-доменом RAGE, методом МД изучена их стабильность. В построенных моделях gHSA карбоксильные группы гликированных Lys317 и Lys525 образуют внутримолекулярные солевые мостики с окружающими аминокислотами, в остальных случаях карбоксильные группы модифицированных лизинов свободны для взаимодействия с положительно заряженными аминокислотными остатками на поверхности RAGE. Согласно данным макромолекулярного докинга и последующей симуляции МД, самым эффективным с точки зрения прочности и специфичности является комплекс RAGE с gHSA, гликированным по Lys233. Специфические комплексы RAGE с gHSA, гликированным по Lys317 и Lys574, не образуются. Полученные данные о взаимодействии gHSA с RAGE помогут понять роль альбумина в патофизиологии СД и продвинуться на пути профилактики и создания эффективной терапии этого заболевания.

Ключевые слова: сахарный диабет, гликированный альбумин, карбоксиметил-лизин, рецептор конечных продуктов гликирования, молекулярное моделирование

DOI: 10.31857/S0869813923120026, EDN: ZJCOKS

ВВЕДЕНИЕ

Заболеваемость сахарным диабетом (СД) достигла уровня глобальной эпидемии, которая является одним из главных факторов смертности населения. В настоящее время количество больных СД во всем мире составляет более 400 миллионов человек, а к 2045 г. эта цифра превысит 600 миллионов [1]. У диабетиков имеет место усиление процесса неферментативной конденсации сахаров с нуклеиновыми кислотами, белками и липидами, что в конечном итоге формирует конечные продукты гликирования (AGE — advanced glycation end products). Гликирование изменяет их структуру и функцию, что приводит к нарушению функции клеток и цитотоксическим эффектам, вследствие чего AGE получили название гликотоксины. По некоторым оценкам в нормогликемической крови от 10 до 18% циркулирующих белков гликируются *in vivo*, тогда как у диабетиков этот процесс выражен гораздо сильнее и достигает 40% [2, 3].

Накопление AGE ведет к нарастанию воспалительных процессов и оксидативному стрессу, причем это во многом зависит от активации и/или повышения экспрессии специфических рецепторов AGE (RAGE) [4], впервые описанных в 1992 г. RAGE — это мультигандный рецептор, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов; его лиганд-связывающий домен распознает помимо AGE большое количество молекул, среди которых наиболее важными являются белки S100, белок бокс-1 группы высокой подвижности (HMGB1 — high mobility group box), β -амилоид и антигенный комплекс макрофагов 1 (Mac-1) [5]. Гликированные продукты и активация RAGE связаны с патофизиологией многих метаболических заболеваний, таких как сахарный диабет 2-го типа (СД2), пищевая аллергия, астма, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), острая почечная недостаточность (ОПН), болезнь Альцгеймера, синдром поликистозных яичников (СПКЯ), ожирение и метаболический синдром [6–10]. AGE способствуют канцерогенезу при хроническом местном воспалении, индуцированном *Helicobacter pylori* [11].

Сывороточный альбумин является мажорным белком крови млекопитающих, где его концентрация составляет 500–700 мкМ. Молекула альбумина не покрыта углеводной оболочкой и может связывать самые разные молекулы и атомы: воду и катионы металлов, жирорастворимые гормоны, жирные кислоты (FA), металлопорфирины, неконъюгированный билирубин, окись азота, аспирин и другие лекарственные средства, токсины [12, 13]. Благодаря своим экстраординарным связывающим свойствам, альбумин существенно влияет на фармакокинетику лекарственных средств, токсикокинетику природных и синтетических ядов, скорость метаболизма. Отличие сывороточного альбумина человека (HSA) от других белков крови состоит в том, что в норме он не гликозилирован (не гликирован, если иметь в виду исключительно неферментативное гликозилирование). Однако количество альбумина существенно превышает количество других белков плазмы крови, поэтому даже небольшой процент гликированного альбумина (gHSA) вносит существенный вклад в общий уровень AGE в организме и позволяет прогнозировать риск развития диабета даже в случае эугликемии [14]. Одним из главных реагентов, обнаруженных *in vivo* в аддуктах с альбумином, является карбоксиметил-лизин (CML, рис. 1) [15].

К настоящему времени идентифицировано более 60 сайтов гликирования HSA [16], но механизм взаимодействия gHSA с RAGE остается практически не изученным. Хie и соавт. с применением метода ЯМР-спектроскопии высокого разрешения изучили взаимодействие различных AGE, включая гликированный альбумин быка (gBSA), с RAGE, выявили участки связывания AGE на поверхности RAGE и предложили свою архитектуру комплекса RAGE с альбумином [17], однако в работе не рассматривали, какие именно лизины альбумина принимают участие во взаимо-

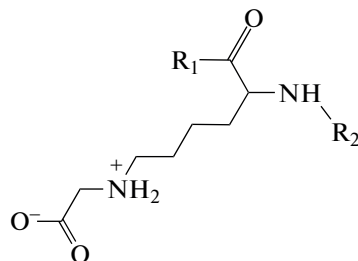


Рис. 1. Химическая структура карбоксиметил-лизина (CML) в составе полипептидной цепи. Состояние протонирования атомов кислорода и азота соответствует физиологическим значениям pH.

действию с RAGE. Tramarin и соавт. в экспериментах *in vitro* и *in silico* изучали взаимодействие gHSA с RAGE, но при этом объектом исследования были продукты Амадори, предшествующие образованию AGE [18]. Цель представленного исследования — методами молекулярного моделирования изучить связывание gHSA с RAGE, определить основные участки взаимодействия и структурные особенности сайтов гликирования, определяющие эффективность образования комплекса с RAGE.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовка трехмерных моделей белков и низкомолекулярных лигандов

Трехмерные модели низкомолекулярных лигандов строили и оптимизировали методом минимизации энергии в вакууме с помощью программного пакета Avogadro v1.2.0 [19]. В качестве трехмерной модели HSA использовали кристаллическую структуру белка из базы данных белковых структур (protein data bank, PDB), код структуры 3JQZ, цепь A [20]. RAGE состоит из трех основных доменов — экстраклеточного лиганд-связывающего, содержащего иммуноглобулиноподобные регионы V (аминокислотные остатки 23–119), C1 (120–233) и C2 (234–325), одинарной трансмембранной спирали (343–363) и короткого С-терминального цитоплазматического домена (364–404). Известно, что несмотря на свое структурное разнообразие, AGE (в том числе и AGE-белки) связываются только с V-доменом RAGE [21]. Считается, что связывание лиганда и последующая активация RAGE, приводящая к передаче сигнала, требуют олигомеризации рецептора [22]. Логичным шагом является для начала смоделировать взаимодействие молекулы альбумина с мономером V-домена, определить самые вероятные (самые прочные) комплексы этих двух белков, чтобы на следующих этапах скомпоновать полученные структуры в димер и определить наиболее вероятную архитектуру комплекса gHSA-RAGE. В качестве трехмерной модели мономера V-домена RAGE использовали структуру, полученную методом ЯМР, из базы данных белковых структур PDB, код структуры 2M1K, цепь A [23]. Молекулы воды, лигандов и неиспользуемые цепи были удалены из структур 3JQZ и 2M1K, пропущенные атомы были достроены с помощью программного пакета Visual Molecular Dynamics v1.9.4a53 (VMD, University of Illinois Urbana-Champaign, США) [24].

Построение модели гликированного альбумина

Процесс гликирования белков нацелен в основном на боковые цепи аргинина, лизина, тиоловые группы цистеина и N-концевые аминокислоты, однако именно гликированные лизины лизин-богатых белков (в том числе альбумина) являются

маркерами возрастных и связанных с возрастом патологий [25]. Как было отмечено выше, конечные продукты гликирования лизина представляют собой преимущественно CML (рис. 1) [15], поэтому в нашей работе мы моделировали именно этот тип гликирования.

Всего в молекуле HSA 59 лизинов, и логично предположить, что RAGE взаимодействует с теми гликированными лизинами, которые находятся на поверхности белка и доступны для взаимодействия. Визуальная инспекция показала, что на поверхности HSA находятся следующие лизины: 4, 20, 41, 51, 64, 73, 136, 137, 159, 162, 174, 212, 225, 233, 240, 262, 313, 317, 323, 359, 372, 378, 389, 444, 475, 545, 557, 560, 564, 573, 574. В обзоре [16] собраны данные литературы о том, какие лизины HSA оказались гликированы при исследовании здоровых испытуемых и пациентов с диабетом. Практические все перечисленные выше лизины, согласно обзору [16], могут быть гликированы. Наиболее часто встречается гликирование следующих лизинов: Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys573, Lys574. Поэтому именно эти девять остатков лизина мы отобрали для построения моделей gHSA. Интересно отметить, что, согласно многочисленным исследованиям, самым реактивным лизином является Lys525 [16]. По этой причине, хотя этот аминокислотный остаток не находится на поверхности белка, мы также включили его в наше исследование.

Модели гликированного альбумина были построены следующим образом. На основании имеющейся информации о зарядах на атомах, длинах связей, значениях валентных и торсионных углов для разных типов атомов и атомных групп, представленной в базе данных программного пакета GROMACS 2019.4 [26], была описана топология CML. Карбоксильную группу CML задавали депротонированной и отрицательно заряженной, а группу атома азота бокового радикала — дважды протонированной и положительно заряженной (рис. 1). Подготовленная топология была добавлена в библиотеку структур аминокислот этого пакета. Затем был проведен молекулярный докинг карбоксиметильной группы в сайты модификации HSA (возле аминокислотных остатков выбранных лизинов). Детали метода молекулярного докинга описаны ниже в разделе “Молекулярный докинг”. На основании внесенных в библиотеку топологий, из комплексов HSA с карбоксиметильной группой, полученных докингом, программой GROMACS были сгенерированы структуры модифицированных лизинов. Полученные структуры gHSA были оптимизированы методом молекулярной динамики (МД). Детали метода МД описаны ниже в разделе “Молекулярная динамика гликированного альбумина и комплексов альбумина с V-доменом RAGE”.

Молекулярный докинг

Для докинга карбоксиметильной группы в сайты гликирования HSA использовали программный пакет Autodock Vina 1.1.2 [27]. В исследуемом сайте связывания белка задавали область поиска размером $15 \times 15 \times 15$ Å. Число запусков (exhaustiveness) принимали равным 10. Количество наиболее оптимальных (энергетически выгодных) конформаций в выходном файле (num_modes) задавали равным 10. Конформация лигандов варьировалась, белок оставался жестким. Для дальнейшей оптимизации отбирали те конформации комплексов, в которых расстояние между функционально значимыми атомами (атом азота бокового радикала лизинов и атом углерода карбоксиметильной группы) было минимальным.

Макромолекулярный докинг

Подготовленные модели gHSA и V-домена RAGE использовали для процедуры макромолекулярного (белок–белкового) докинга. Докинг проводили с помощью онлайн-сервиса ZDOCK 3.0.2 (<https://zdock.umassmed.edu/>) [28]. В качестве сайта

связывания на поверхности gHSA задавали модифицированный лизин, для V-домена RAGE (обозначим его сокращенно V) областью поиска задавали всю поверхность белка. Программа ZDOCK ранжирует все найденные конформации белкового комплекса по величине оценочной функции (ОФ), которая отражает энергетические характеристики комплекса и определяет вероятность его нахождения в данной конформации. ОФ базируется на статистическом потенциале контакта атомов на поверхности белков (interface atomic contact energy statistical potential), комплементарности поверхности (shape complementarity) и электростатических взаимодействиях [29]. Чем выше значение ОФ, тем выше вероятность нахождения комплекса именно в этой конформации. Результатом запуска программы ZDOCK для каждой пары gHSA-V является набор из 10 наиболее энергетически выгодных конформаций комплекса. Для каждой пары gHSA-V из полученных конформаций мы отбирали наиболее вероятную конформацию на основании двух критериев. Первый критерий заключается в том, что при наложении полученного докингом комплекса gHSA-V на экспериментальную трехмерную структуру VC1-домена RAGE (код PDB 4OI7 [30]) молекула альбумина не должна накладываться на C1-домен (то есть, альбумин должен пристыковаться не со стороны C1-домена). Второй критерий состоит в том, что в полученном докингом комплексе гликированный лизин должен взаимодействовать с одним из сайтов IS (interaction surface) на поверхности V-домена (рис. 2): IS1 (Leu36, Lys37, Cys38, Lys39, Gly40, Ala41, Lys43, Leu49, Asn81, Cys99), IS2 (Arg48, Glu50, Arg98, Met102, Asn105, Gly106, Lys107) или IS3 (Arg28, Arg29, Ile30, Ile91, Glu94, Gly95). IS — это области взаимодействия гликированного лизина в составе AGE-пептидов и gBSA с поверхностью V-домена, выявленных экспериментально в работе с применением метода ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [17].

Стабильность полученных комплексов проверяли методом МД, детали метода описаны ниже.

Молекулярная динамика гликированного альбумина и комплексов альбумина с V-доменом RAGE

Конформационные изменения gHSA, а также комплексов gHSA с V-доменом RAGE во времени рассчитывали методом МД с помощью программного пакета GROMACS 2019.4 [26] с использованием силового поля CHARMM27 [31]. Молекулу gHSA (или комплекс gHSA-V) виртуально помещали в периодическую кубическую ячейку, заполненную молекулами воды. Для описания молекул воды использовали потенциал TIP3P (transferable intermolecular potential with 3 points) [32]. Для нейтрализации заряда в систему были добавлены ионы натрия. В расчетном эксперименте поддерживалась постоянная температура 300 К и постоянное давление 1 бар с помощью термостата “V-rescale” [33] и баростата Паринелло–Рамана [34]. Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда [35]. При межатомном расстоянии больше 1 нм взаимодействиями Леннарда-Джонса пренебрегали. Длины связей в молекулах поддерживали постоянными с помощью алгоритма LINCS [36]. Перед расчетом конформационных изменений система подвергалась релаксации продолжительностью 6 нс. Время симуляции конформационных изменений составило 50 нс для молекул gHSA и 100 нс для комплексов gHSA-V с шагом интегрирования 0.002 пс.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Построение моделей гликированного альбумина

Методами молекулярного докинга и МД мы построили десять моделей gHSA, в каждой из которой гликирован соответствующий аминокислотный остаток лизина:

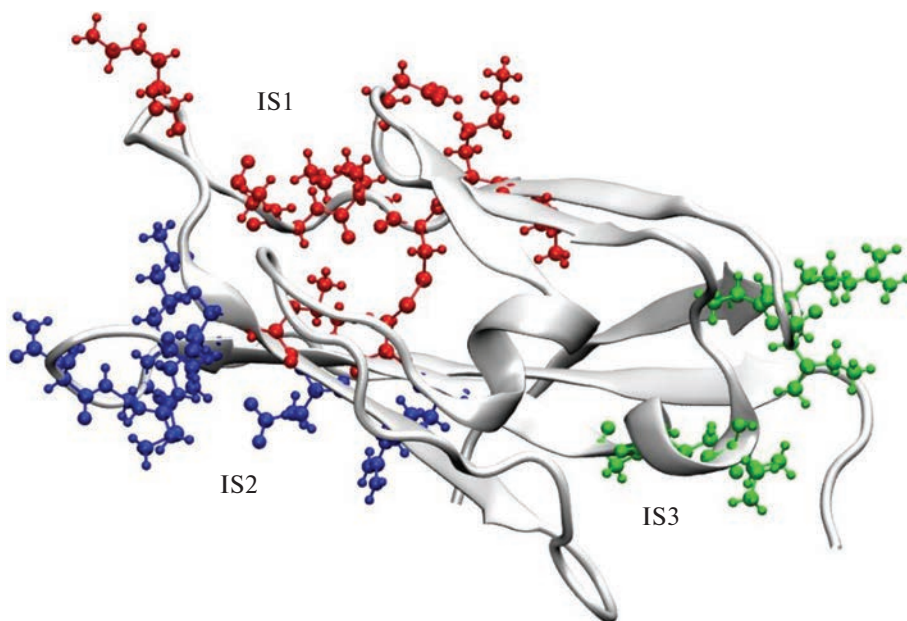


Рис. 2. Области взаимодействия (IS – interaction surface) гликированного лизина в составе AGE-пептидов и gBSA с поверхностью V-домена, выявленные экспериментально [17]. IS1 (Leu36, Lys37, Cys38, Lys39, Gly40, Ala41, Lys43, Leu49, Asn81, Cys99, выделены красным цветом), IS2 (Arg48, Glu50, Arg98, Met102, Asn105, Gly106, Lys107, выделены синим цветом) и IS3 (Arg28, Arg29, Ile30, Ile91, Glu94, Gly95, выделены зеленым цветом).

Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys525, Lys573 и Lys574. Более подробно процедура подготовки моделей описана в разделе “Методы исследования”, подразделе “Молекулярная динамика гликированного альбумина и комплексов альбумина с V-доменом RAGE”. На рис. 3 представлено наложение полученных моделей.

Ожидается, в процессе симуляции МД все изученные модифицированные лизины благодаря гидрофильной карбоксильной группе занимают такие конформации, в которых их боковой радикал максимально доступен растворителю. Даже боковой радикал Lys525, который в кристаллической структуре HSA погружен в глобулу белка, после модификации за счет удлинения цепочки бокового радикала на два атома углерода оказывается на поверхности, становится доступен растворителю (карбоксильная группа модифицированного Lys525 после 100 нс симуляции окружена четырьмя молекулами воды) и потенциально может контактировать с RAGE. Поэтому на данном этапе мы не стали исключать ни один из рассмотренных лизинов и на следующем шаге провели макромолекулярный докинг десяти вариантов gHSA (гликированного по десяти рассмотренным лизинам) с V-доменом RAGE. Однако стоит отметить, что в случае модифицированных Lys317 и Lys525, карбоксильная группа CML вовлечена в образование солевых мостиков с соседними аминокислотами (Lys313 и Arg521 соответственно), что потенциально может затруднить взаимодействие этих гликированных лизинов с аминокислотами поверхности RAGE. В случае других моделей gHSA, карбоксильная группа CML не вовлечена в близкие контакты с окружающими аминокислотными остатками.

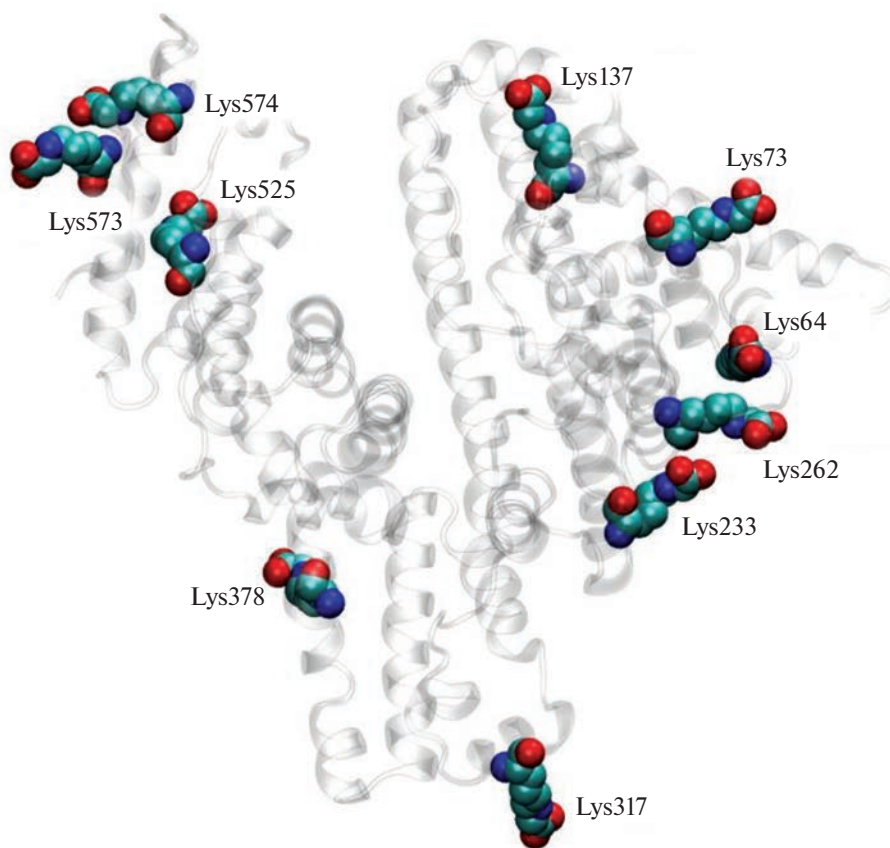


Рис. 3. Наложение трехмерных структур gHSA, гликированного по аминокислотным остаткам Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys525, Lys573 и Lys574, полученных методом МД. Модифицированные лизины показаны цветными сферами, остов молекулы gHSA — серой лентой. Атомы водорода не показаны для четкости рисунка.

Макромолекулярный докинг гликированного альбумина с V-доменом RAGE

Результаты макромолекулярного докинга gHSA с V-доменом RAGE представлены на рис. 4 и в табл. 1. В случае гликирования по Lys64, CML в полученном комплексе взаимодействует с Lys52 и Arg98 RAGE, при этом с Arg98, который является частью IS2, Lys64 образует солевой мостик (рис. 4a). Гликированный Lys73 в комплексе с RAGE взаимодействует с Lys107, Glu108, Thr109, и в этой тройке Lys107 также является частью IS2 (рис. 4b). В случае гликирования Lys137, модифицированный лизин взаимодействует с Arg48 сайта IS2 RAGE (рис. 4c). Гликированный Lys233 связывается в окружении аминокислот Tyr113, Cys38, Cys99, Lys39 RAGE (все, кроме Tyr113, входят в состав IS1) (рис. 4d). Модифицированный Lys262 в комплексе с RAGE взаимодействует с Lys39, Ala41, Pro42 (первые два остатка являются частью IS1) (рис. 4e). В случае гликированных Lys317 и Lys378 методом молекулярного докинга не удалось выявить конформации, в которых бы эти лизины взаимодействовали с IS1, IS2 или IS3. Поэтому для дальнейшего анализа мы отобрали самые вероятные (по оценочной функции ZDOCK) конформации из тех, в которых нет наложения на C1-домен. В этих конформациях гликированный Lys317

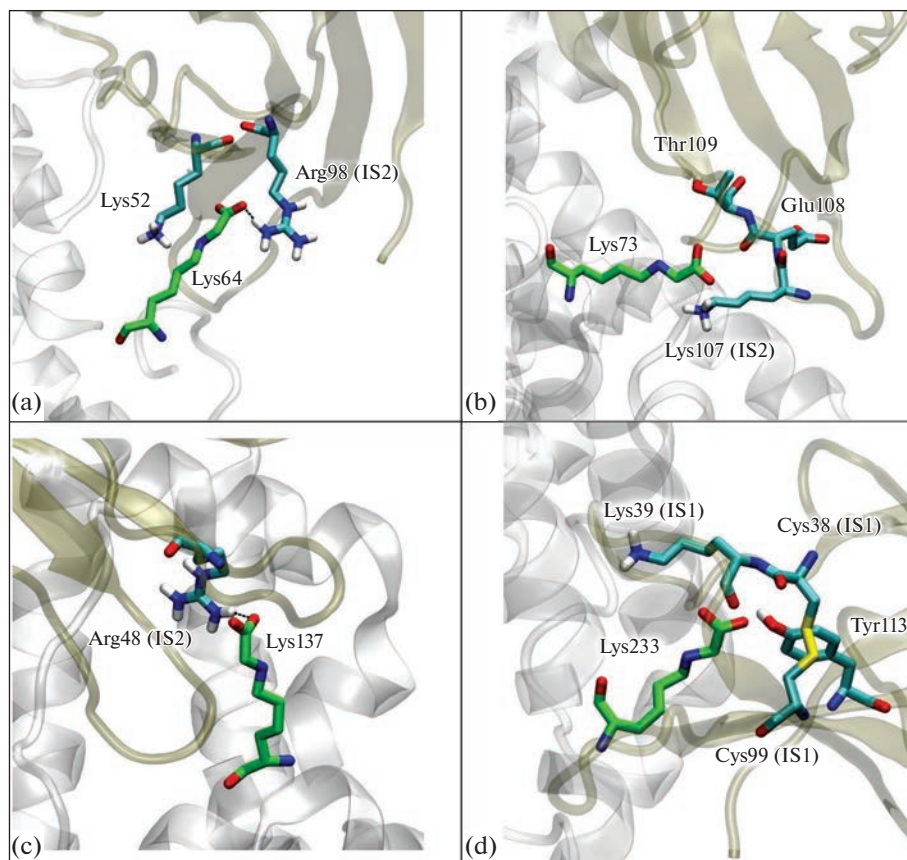


Рис. 4. Взаимодействие gHSA с поверхностью V-домена RAGE по данным макромолекулярного докинга. Изучены модели gHSA, гликированного по Lys64 (a), Lys73 (b), Lys137 (c), Lys233 (d), Lys262 (e), Lys317 (f), Lys378 (g), Lys525 (h), Lys573 (i), Lys574 (j). Зеленым цветом отмечены атомы углерода модифицированных лизинов. Остов HSA показан серой лентой, остов V-домена RAGE – коричневой лентой. Второстепенные атомы водорода не показаны для четкости рисунка. IS1 и IS2 (interaction surface 1 и 2) – экспериментально выявленные области взаимодействия гликированного лизина (в составе AGE-пептидов и gBSA) с RAGE по данным Xie и соавт. [17].

взаимодействует с Arg116, Ile120 и Pro121 (образуя при этом внутримолекулярный солевой мостик с Lys313 HSA, рис. 4f), а Lys378 – с Arg77 (солевой мостик), Val78 и Leu79 (рис. 4g). Гликированный Lys525 связывается недалеко от аминокислот Glu50, Lys52 и Trp61 RAGE (Glu50 включен в IS2) (рис. 4h), однако из-за внутримолекулярного солевого мостика с Arg521 модифицированный Lys525 не образует близких контактов с аминокислотами RAGE. И, наконец, модифицированные Lys573 и Lys574 ни в одном из найденных докингом комплексов вообще не взаимодействуют с поверхностью RAGE. Поэтому в случае Lys573 и Lys574 мы отобрали самые вероятные конформации из тех, в которых нет наложения на C1-домен (рис. 4i и 4j).

В табл. 1 для отобранных конформаций приведены значения ОФ, которые, как было упомянуто в разделе “Методы”, характеризует вероятность нахождения белкового комплекса в данной конформации: чем выше значение ОФ, тем выше вероятность. Согласно данным, представленным в табл. 1, самые энергетически выгодные конформации были найдены для гликированных Lys137, Lys233, Lys262 и Lys317.

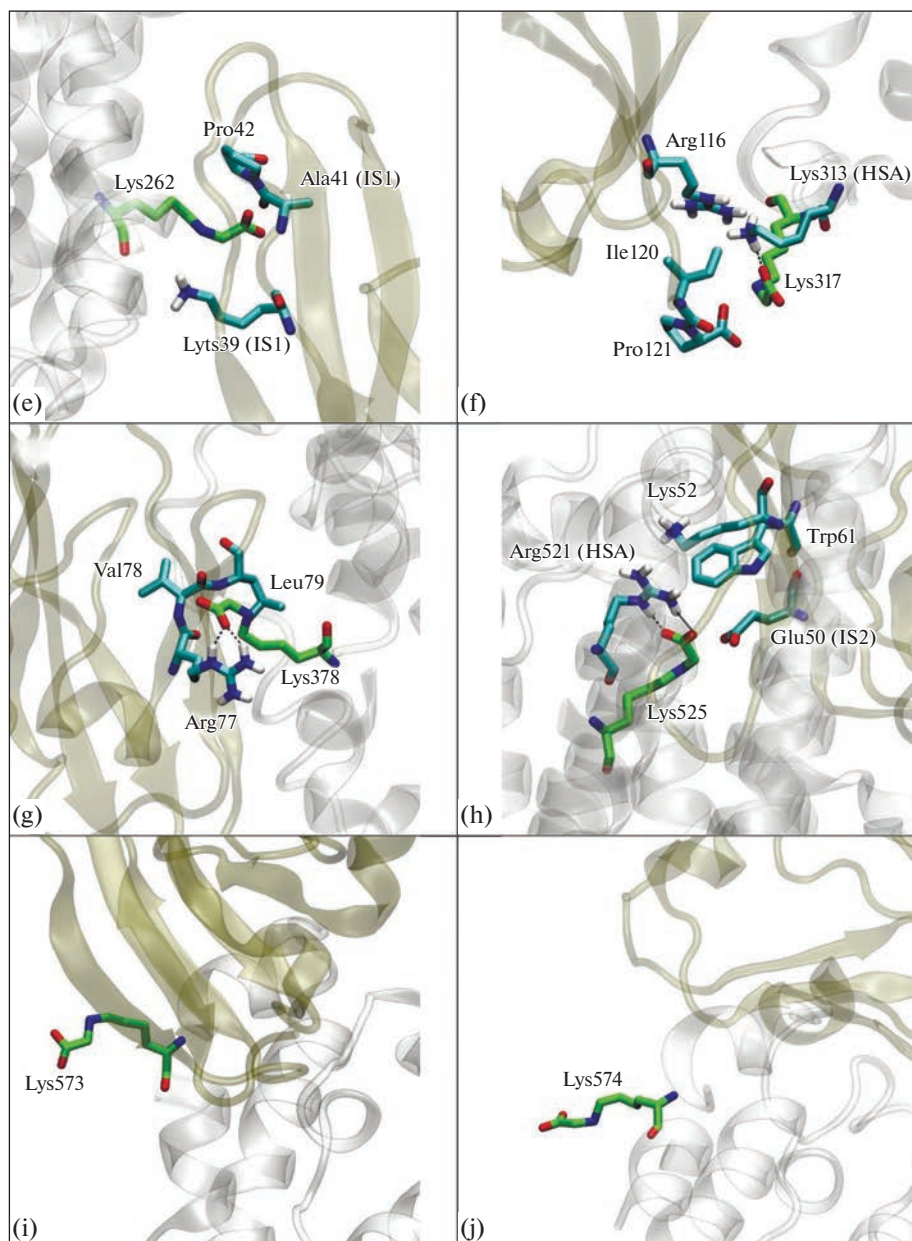


Рис. 4. Окончание.

На следующем этапе методом МД мы проверили стабильность комплексов gHSA-V, полученных методом макромолекулярного докинга. Несмотря на то, что по данным докинга гликированные Lys573 и Lys574 не взаимодействуют с поверхностью RAGE, мы не стали исключать их, чтобы проверить, не перейдет ли молекула gHSA, гликированная по Lys573 и Lys574, в процессе симуляции МД в конформацию, в которой эти лизины смогут контактировать с RAGE.

Таблица 1. Значения оценочной функции (ОФ) конформаций gHSA-RAGE по данным макромолекулярного докинга

Модифицированный Lys	ОФ
Lys64	741.025
Lys73	888.287
Lys137	1011.244
Lys233	1059.251
Lys262	963.003
Lys317	1034.777
Lys378	878.667
Lys525	828.496
Lys573	895.530
Lys574	828.557

Взаимодействие gHSA с V-доменом RAGE по данным метода молекулярной динамики

В вычислительных экспериментах принято оценивать эффективность взаимодействия лиганда с рецептором по величине свободной энергии связывания ΔG . Одна из основных проблем при вычислении ΔG состоит в том, что очень сложно с хорошей точностью оценить энтропийный компонент, что особенно критично для макромолекулярных комплексов. Поэтому для комплексов белок–белок более разумным представляется оценивать прочность связывания по количеству контактов между белками. Такой способ применили в работе [37] для оценки эффективности взаимодействия S-белка SARS-CoV-2 и ACE2 в гипергликемической среде. В нашей работе мы также использовали этот подход и оценивали прочность комплексов gHSA и RAGE по числу атомов, образующих близкие контакты между белками (на расстоянии не больше 3.5 ангстремов). В табл. 2 приведена информация о количестве атомов, образующих контакты в комплексах gHSA с RAGE по данным МД, показаны основные аминокислоты, участвующие во взаимодействии, а также перечислены специфические контакты между белками и время их жизни в процентном отношении к длине симуляции.

На рис. 5 представлены трехмерные модели комплексов gHSA с RAGE по данным МД. Согласно полученным данным, в восьми комплексах (из десяти изученных) модифицированный лизин взаимодействует с RAGE. В случае гликирования Lys64 (рис. 5a), CML образует два долгоживущих солевых мостика с Lys52 и Arg98 RAGE, при этом Arg98 является частью сайта IS2. Белки образуют семь солевых мостиков, пять из которых существуют на протяжении более чем 70 нс симуляции (табл. 2). Важно отметить, что пять аминокислот из тех, что участвуют в связывании gHSA, гликированного по Lys64, находятся в близком контакте с димером белка S100P (а именно Arg48, Lys52, Trp61, Lys62, Arg98) в структуре, полученной экспериментально методом ЯМР [38].

При гликировании Lys73 (рис. 5b) CML вовлечен в солевой мостик с Lys39 RAGE, который является частью сайта IS1, однако этот контакт образуется лишь на последних 30 нс симуляции. Всего же между RAGE и gHSA, гликированным по Lys73, формируется семь специфических контактов (шесть солевых мостиков и одна водородная связь), три из которых существуют 50 нс и дольше. В случае гликирования Lys137 (рис. 5c) CML на протяжении 95% симуляции образует солевой мостик с Arg48 RAGE, который является частью сайта IS2. В этом комплексе белки образуют семь специфических взаимодействий (пять солевых мостиков и две водо-

Таблица 2. Количество атомов, образующих контакты в комплексах gHSA с RAGE по данным МД, специфические контакты gHSA-RAGE и время их жизни в процентном отношении к длине симуляции

CML	Количество контактов (gHSA/RAGE) Специфические контакты gHSA-RAGE и время их жизни
Lys64	63/73 Glu45-Arg48 ^{IS2} (CM, 100%); Glu48-Lys107 ^{IS2} (CM, 30%); Lys64-Lys52 (CM, 80%); Lys64-Arg98 ^{IS2} (CM, 95%); Asp72-Lys52 (CM, 80%); Glu86-Lys62 (CM, 50%); Glu95-Lys52 (CM, 70%)
Lys73	66/68 Glu37-Gln24 (BC, 40%); Asp38-Lys37 ^{IS1} (CM, 40%); Glu45-Lys39 ^{IS1} (CM, 65%); Lys73-Lys39 ^{IS1} (CM, 30%); Glu82-Lys37 ^{IS1} (CM, 40%); Asp129-Arg114 (CM, 85%); Asp129-Arg116 (CM, 60%)
Lys137	68/58 Glu37-Arg48 ^{IS2} (CM, 5%); Asp38-Arg104 (CM, 50%); Asp38-Gln47 (BC, 10%); Glu82-Lys44 (CM, 5%); Glu83-Asn105 (BC, 5%); Arg114-Glu108 (CM, 20%); Lys137-Arg48 (CM, 95%)
Lys233	118/111 His3-Asn81 (BC, 95%); Glu6-Lys83 (CM, 95%); Glu208-Lys107 ^{IS2} (CM, 95%); Lys212-Glu108 (CM, 75%); Glu230-Lys110 (CM, 20%); Lys233-Lys39 ^{IS1} (CM, 80%); Lys233-Ser111 (BC, 65%); Lys233-Tyr113 (BC, 40%); Thr236-Glu108 (BC, 60%); Asp237-Lys39 ^{IS1} (CM, 80%); Glu252-Lys43 ^{IS1} (CM, 98%); Asp255-Lys37 ^{IS1} (CM, 60%); Asp256-Lys37 ^{IS1} (CM, 60%); Asp259-Lys37 ^{IS1} (CM, 60%)
Lys262	65/54 Asp13-Lys43 ^{IS1} (CM, 90%); Lys233-Glu108 (CM, 90%); Thr236-Asn105 (BC, 90%); Glu252-Lys44 (CM, 70%); Asp255-Lys43 ^{IS1} (CM, 90%); Asp256-Lys44 (CM, 75%); Asp259-Lys107 ^{IS2} (CM, 10%); Lys262-Lys39 ^{IS1} (CM, 10%); Tyr263-Glu108 (BC, 90%); Glu266-Lys39 ^{IS1} (CM, 70%)
Lys317	30/36 Glu230-Lys39 ^{IS1} (CM, 2%); Lys233-Ser11 (BC, 10%); Asp259-Lys107 (CM, 70%)
Lys378	116/109 Glu297-Lys39 ^{IS1} (CM, 50%); Glu311-Arg29 ^{IS3} (CM, 80%); Phe374-Phe85 (CB, 20%); Asp375-Arg77 (CM, 95%); Lys378-Arg77 (CM, 20%); Gln385-Pro80 (BC, 60%); Glu442-Arg48 ^{IS2} (CM, 30%)
Lys525	101/109 Glu119-Lys107 ^{IS1} (CM, 80%); Asp173-Lys39 ^{IS1} (CM, 90%); Asp183-Asn105 ^{IS2} (BC, 60%); Glu184-Lys44 (CM, 65%); Glu518-Lys52 (CM, 80%); Lys519-Glu108 (CM, 90%); Glu520-Arg104 (CM, 80%); Lys525-Arg48 ^{IS1} (CM, 5%); Asp562-Arg57 (CM, 90%)
Lys573	47/59 Val116-Pro66 (BC, 5%); Asp512-Arg77 (CM, 50%); Lys573-Arg29 ^{IS3} (CM, 30%); Glu565-Arg77 (CM, 70%)
Lys574	142/139 Asp129-Arg104 (CM, 80%); Asp121-Lys43 ^{IS1} (CM, 20%); Glu37-Arg48 ^{IS2} (CM, 60%); Glu565-Lys37 ^{IS1} (CM, 90%); Glu505-Arg77 (CM, 70%); Phe36-Gln67 (BC, 30%); Tyr140-Gln67 (BC, 60%); Lys573-Gly31 (BC, 80%); Arg114-Ser74 (BC, 10%)

Символами IS1, IS2 и IS3 отмечены аминокислоты, принадлежащие экспериментально выявленным сайтам взаимодействия RAGE с AGE-пептидами и gBSA [17]. CM — солевой мостик, BC — водородная связь, CB — стэкинг-взаимодействие.

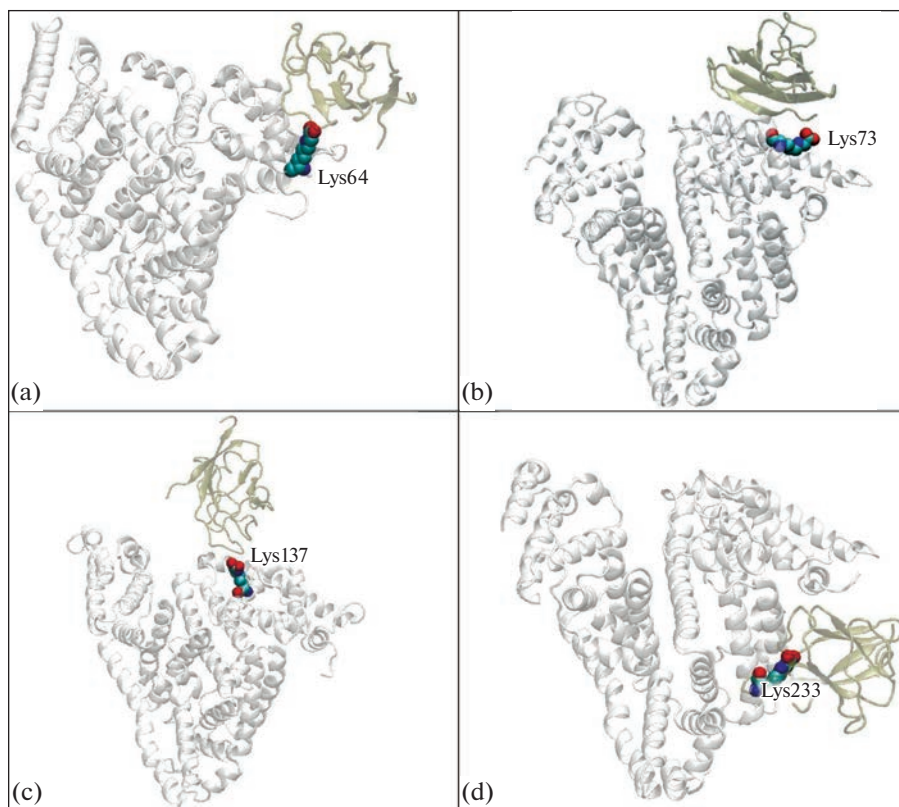


Рис. 5. Взаимодействие gHSA с поверхностью RAGE по данным МД. Изучены модели gHSA, гликированного по Lys64 (a), Lys73 (b), Lys137 (c), Lys233 (d), Lys262 (e), Lys317 (f), Lys378 (g), Lys525 (h), Lys573 (i), Lys574 (j). Остов HSA показан серой лентой, остов V-домена RAGE — коричневой лентой. Модифицированные лизины показаны цветными сферами. Атомы водорода не показаны для четкости рисунка.

родные связи), но большая часть из них формируется уже на последнем этапе симуляции (табл. 2).

При гликировании Lys233 (рис. 5d) CML на протяжении 80 нс вовлечен в солевой мостик с Lys39 сайта IS1 RAGE, а также образует водородные связи с Ser111 и Tyr113 на протяжении 65 и 40 нс соответственно, при этом Lys39 является частью сайта IS1. По количеству близких контактов (более ста) и специфических взаимодействий (десять солевых мостиков и четыре водородные связи, большая часть из которых существует на протяжении почти всей симуляции) этот комплекс является лидером по эффективности взаимодействия (табл. 2). Важно отметить, что аминокислотные остатки Asp256 и Asp259 gHSA, участвующие во взаимодействии с RAGE, вплотную примыкают к сайту Садлоу I альбумина, в котором связываются такие вещества, как тироксин, варфарин, азидотимидин, индометацин [39]. Более того, известно, что Asp256 принимает участие в связывании катиона кобальта [40]. Не исключено, что гликирование Lys233 HSA и последующее связывание белка с V-доменом RAGE может значительно повлиять на взаимодействие перечисленных веществ с альбумином.

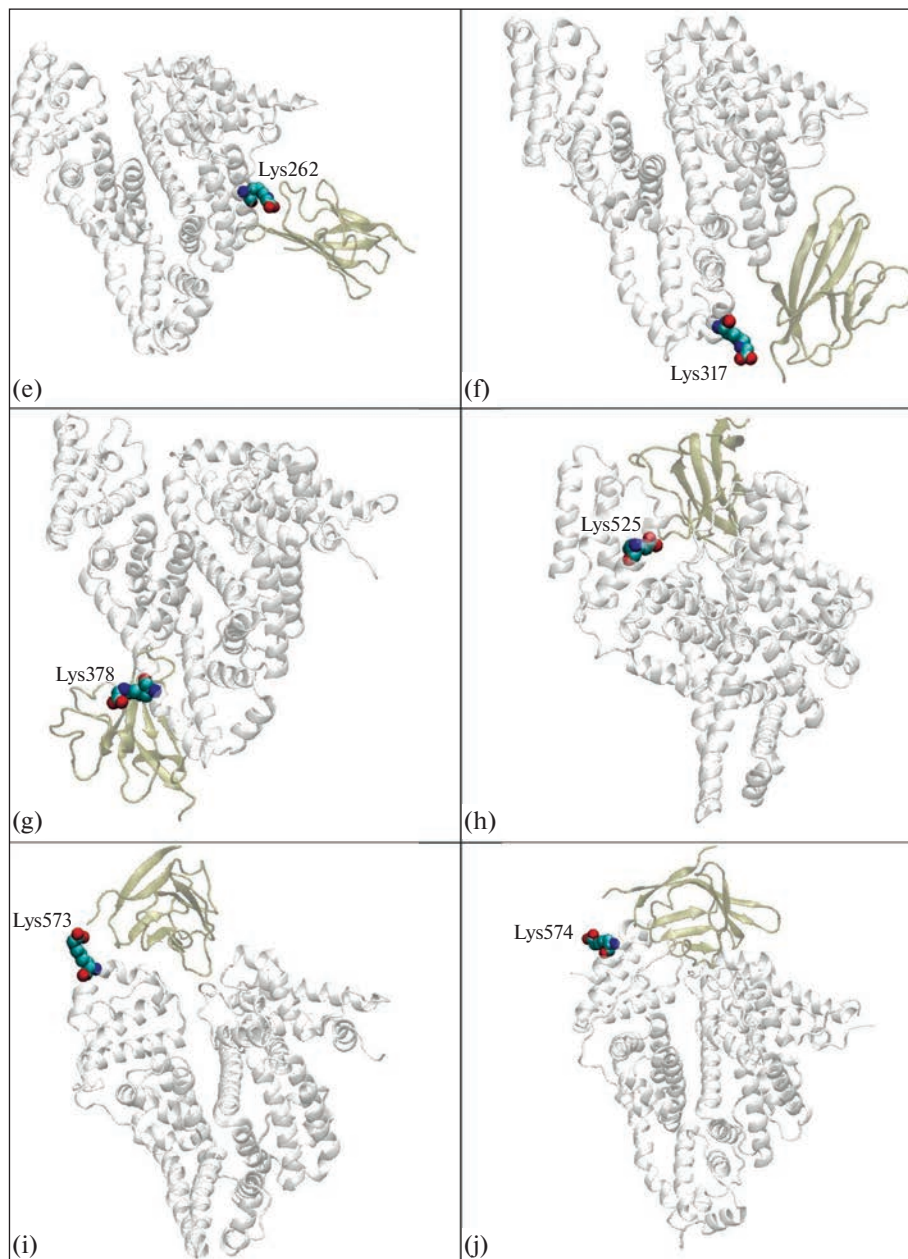


Рис. 5. Окончание.

Поскольку Lys233 и Lys262 расположены близко друг к другу на поверхности альбумина (рис. 3), в случае гликирования Lys262 V-домен связывается с gHSA примерно в той же области, что и в случае гликирования Lys233 (рис. 5e). CML образует солевой мостик с Lys39 RAGE, являющегося частью сайта IS1. Однако этот контакт слабее аналогичного контакта CML233-Lys39, описанного выше, и суще-

ствуется лишь на протяжении 10 нс симуляции. В общей сложности в этом комплексе формируется восемь солевых мостиков и две водородные связи, почти все они сохраняются на протяжении 70 нс и дольше (табл. 2).

По данным макромолекулярного докинга, модифицированный Lys317 взаимодействовал с Arg116, Ile120 и Pro121 RAGE, но, согласно данным МД, этот комплекс оказался нестабильным. В конформации, полученной методом МД (рис. 5f), аминокислоты Lys39 (IS1) и Lys107 (IS2) участвуют во взаимодействии с альбумином, но при этом сам карбоксиметил-лизин не взаимодействует ни с одной аминокислотой RAGE. По количеству контактов этот комплекс также оказался самым непрочным (табл. 2). Поэтому можно сделать вывод, что в реальности RAGE не взаимодействует с гликированным Lys317. Мы полагаем, что эта особенность связана с образованием внутримолекулярного солевого мостика между Lys317 и Lys313 gHSA (рис. 4f), который не позволяет модифицированному Lys317 взаимодействовать с положительно заряженными аминокислотами на поверхности V-домена.

В случае гликирования Lys378 (рис. 5g) CML образует солевой мостик с Arg77 и стерическое взаимодействие с Val78 RAGE. Эти аминокислоты не принадлежат сайтам взаимодействия IS, описанным в [17], более того, стабильное взаимодействие с Arg77 существует только в течение 20 нс симуляции (первые и последние 10 нс). Однако в этом комплексе целых пять аминокислот сайтов IS, а именно Arg29 (IS3), Lys37 (IS1), Lys39 (IS1), Arg48 (IS2) и Asn81 (IS1) принимают участие во взаимодействии с gHSA. Белки образуют пять солевых мостиков, одну водородную связь и одно стэкинг-взаимодействие; четыре из семи описанных контактов сохраняются на протяжении 60 нс и более. По количеству неспецифических контактов (стерических взаимодействий) этот комплекс — один из лидеров (табл. 2). Поэтому, мы полагаем, этот комплекс специфичный (CML принимает участие во взаимодействии с RAGE) и прочный (много близких контактов между белками и участие пяти аминокислот сайтов IS во взаимодействии).

По данным макромолекулярного докинга, модифицированный Lys525 связывался недалеко от Lys52 RAGE. Образованию солевого мостика с Lys52 мешал внутримолекулярный солевой мостик между Lys525 и Arg521. В процессе симуляции конформация комплекса поменялась (рис. 5h). По данным МД, в конечной точке траектории Lys525 взаимодействует с Arg48 RAGE, относящегося к сайту IS2. Однако сближение между этими аминокислотами происходит лишь на последних наносекундах симуляции, образованию прочной ионной связи Lys525-Arg48 препятствует внутримолекулярное взаимодействие между модифицированным Lys525 и аминокислотами Arg521 и Gln522 альбумина. Тем не менее, комплекс оказался достаточно прочным, образуя больше сотни близких контактов между gHSA и RAGE. В комплексе формируется восемь солевых мостиков и одна водородная связь, большинство из них сохраняются длительный период симуляции (табл. 2). Важно отметить, что аминокислоты Glu119, Pro180 и Asp183 HSA, участвующие во взаимодействии с V-доменом, примыкают к лиганд-связывающему сайту III альбумина, в котором связываются такие вещества, как гемин, билирубин, лидокаин [39]. Взаимодействие RAGE с этой областью альбумина может повлиять на метаболизм и фармакокинетику этих лигандов.

В случае гликирования Lys573 (рис. 5i) CML контактирует с Arg29 сайта IS3 RAGE на протяжении 30 нс симуляции, другие аминокислоты сайтов IS во взаимодействии с gHSA не участвуют. Специфических взаимодействий между белками также практически не образуется (табл. 2). В случае гликирования Lys574 (рис. 5j), несмотря на прочность комплекса (более 100 близких контактов между gHSA и RAGE, пять солевых мостиков и четыре водородные связи, табл. 2), это взаимодействие носит неспецифический характер, поскольку в этом комплексе CML не контактирует ни с одной аминокислотой RAGE.

Таким образом, согласно полученным данным, безусловным лидером по эффективности взаимодействия является комплекс RAGE с gHSA, гликированным по Lys233. Также весомой специфичностью (долгий прочный контакт CML с V-доменом и большое число специфических взаимодействий) обладает комплекс RAGE с gHSA, гликированным по Lys64. Следующими в списке можно отметить случаи модификации Lys262 и Lys525 — в этих комплексах много долгоживущих ионных взаимодействий, но слабый контакт непосредственно между CML и V-доменом. И, наконец, заслуживает внимания комплекс RAGE с gHSA, гликированным по Lys378, который характеризуется невысокой специфичностью, но при этом большим количеством вандерваальсовых взаимодействий. Остальные комплексы отличаются как низкой специфичностью, так и меньшим количеством стерических контактов, а в случае гликирования Lys317 и Lys574 специфические комплексы RAGE с gHSA и вовсе не образуются (CML вообще не взаимодействует ни с одной из аминокислот на поверхности V-домена).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Работы, доказывающие взаимодействие gHSA с RAGE эндотелиальных клеток (ЭК), появились в 1990-е годы [21, 41], существенно позже были опубликованы данные о взаимодействии gHSA с RAGE адипоцитов [42]. С тех пор накапливаются данные о ключевой роли взаимодействия gHSA с RAGE в патогенезе многих заболеваний, в первую очередь СД и сопутствующих патологий [43]. Интересно отметить, что в плазме крови человека обнаружена растворимая форма RAGE (sRAGE), состоящая из внеклеточных доменов V, C1 и C2 [44], более того, уровень sRAGE повышен при СД [45, 46]. sRAGE может связывать AGE, тем самым предотвращая их взаимодействие с клеточным RAGE. Таким образом, если бы удалось найти способ ингибирования процесса взаимодействия gHSA с RAGE и/или усиления взаимодействия с sRAGE, это могло бы стать средством подавления клеточной активации и ограничения долгосрочного повреждения тканей при хронических заболеваниях.

Для этой цели первоочередной задачей является выявление молекулярного механизма взаимодействия gHSA с RAGE. Однако исследований, посвященных этой задаче, пока очень мало. Так, Xie и соавт. [17] методом ЯМР изучая взаимодействие AGE-пептидов и gBSA с RAGE, установили, что только V-домен RAGE участвует в связывании AGE-пептидов и gBSA, а также выявили аминокислоты на поверхности V-домена, принимающие участие в этом взаимодействии (аминокислоты перечислены выше в подразделе “Макромолекулярный докинг” раздела “Методы”). Более того, Xie и соавт. показали, что аффинность альбумина к мономеру V-домена ниже, чем к полному рецептору RAGE, и предположили, что в реальности альбумин связывается не с одной, а с несколькими молекулами RAGE, то есть происходит димеризация или даже олигомеризация рецептора. Таким образом, ключевым отличием взаимодействия gHSA с RAGE от взаимодействия с sRAGE, по всей видимости, является этап олигомеризации клеточной формы рецептора. По этой причине важно определить структуру комплексов gHSA-V: зная механизм взаимодействия gHSA с V-доменом, можно в дальнейшем получить информацию о механизме олигомеризации рецептора и попытаться найти способ предотвратить этот процесс.

Несмотря на существенный вклад в изучение механизма взаимодействия альбумина с RAGE, Xie и соавт. в своей работе [17] не рассматривали, какие именно лизины альбумина принимают участие во взаимодействии с RAGE. Такую попытку предприняли Tramagin и соавт. в своем исследовании [18]. Согласно данным, полученным в работе [18] (комбинируя эксперименты *in vitro* и *in silico*), ключе-

вую роль во взаимодействии gHSA с RAGE играют гликированный Lys525 альбумина и Arg98 V-домена RAGE (здесь и дальше при обсуждении мы приводим нумерацию аминокислот, соответствующую первичной последовательности RAGE из базы данных Uniprot [47], код структуры Q15109, тогда как авторы работы [18] используют нумерацию, не включающую сигнальную последовательность). Также, согласно данным Tramari и соавт. [18], во взаимодействии gHSA с RAGE со стороны альбумина принимают участие аминокислоты Glu184, Glu188, Glu400, Lys432, Glu518 и Glu556, а со стороны RAGE — Lys107, Glu108, Lys110, Arg114. Это частично согласуется с нашими данными: согласно нашим расчетам, во взаимодействии RAGE с gHSA, гликированным по Lys525, участвуют Glu184 и Glu518 альбумина, а также Lys107 и Glu108 V-домена RAGE. Другие аминокислоты, упомянутые Tramari и соавт., тоже принимают участие во взаимодействии с альбумином, но гликированному по другим лизинам (Lys64, Lys73, Lys233 и Lys262). Возможно, частичное несоответствие может быть связано с тем, что Tramari и соавт. изучали другой тип гликирования Lys525 (аддукты Амадори, более ранняя стадия гликирования белков). Тем не менее, и в работе [18], и в наших исследованиях показано, что во взаимодействии гликированного по Lys525 gHSA с RAGE участвуют домены IB и IIIB альбумина.

Можно также сравнить полученные нами *in silico* комплексы gHSA-V с полученной экспериментально структурой V-домена RAGE в комплексе с фрагментом BSA Asp¹²⁴-Glu¹²⁵-Phe¹²⁶-CEL¹²⁷-Ala¹²⁸-Asp¹²⁹-Glu¹³⁰ (BSA¹²⁴⁻¹³⁰), где CEL — это карбоксиэтил-лизин (структура PDB 2L7U [48], получена методом ЯМР). В этом комплексе CEL взаимодействует с остатками Arg98, Gln100 и Lys110 (по нумерации UniProt). В альбумине человека этому фрагменту соответствует фрагмент Thr¹²⁵-Ala¹²⁶-Phe¹²⁷-His¹²⁸-Asp¹²⁹-Asn¹³⁰-Glu¹³¹, то есть в соответствующем пептиде HSA лизин заменен на гистидин. Остатки гистидина также могут быть подвержены гликированию, в дальнейших исследованиях мы планируем изучить взаимодействие гликированного His128 gHSA с RAGE. Пока же можно отметить, что комплекс V-домена с gHSA, гликированным по Lys64, наиболее близок к структуре 2L7U. В обеих структурах модифицированный лизин взаимодействует с Arg98. Однако в комплексе gHSA-V модифицированный лизин Lys64, в отличие от структуры 2L7U, не взаимодействует с Gln100 и Lys110 RAGE. Наложение этих структур представлено на рис. 6а. Как можно увидеть, положение CML относительно RAGE в комплексе с gHSA-V, полученном *in silico*, не совпадает с положением CEL в комплексе с BSA, полученном методом NMR [48]. Однако, мы полагаем, что дело тут не только в ограничениях методов молекулярного моделирования. Пептид, состоящий из 7 аминокислот, — не то же самое, что целая молекула альбумина, состоящая из более чем 580 аминокислот. На рис. 6б представлено наложение структуры 2L7U с полной молекулой BSA (структура PDB 6QS9, цепь А [49]) и структурой VC1-домена RAGE (структура PDB 4OI8, цепь А [30]). При наложении этих структур молекула BSA существенно перекрывается с C1-доменом of RAGE (рис. 6б), то есть конформация комплекса RAGE с BSA, гликированным по Lys127, должна отличаться от конформации комплекса V-домена с пептидом BSA¹²⁴⁻¹³⁰. В отсутствие экспериментальных данных о строении комплекса gHSA с RAGE, только метод макромолекулярного докинга с последующей оптимизацией методом МД может дать первичное представление об этой структуре (с пониманием того, что методы *in silico* имеют свои ограничения, и это представление будет лишь оценочным).

Можно отметить еще один пункт прикладной значимости полученных результатов. Известно, что HSA, с одной стороны, является транспортным белком для многих эндогенных и экзогенных лигандов, с другой стороны — подвержен аллостерической модуляции (связывание лигандов в одном сайте влияет на связывание в

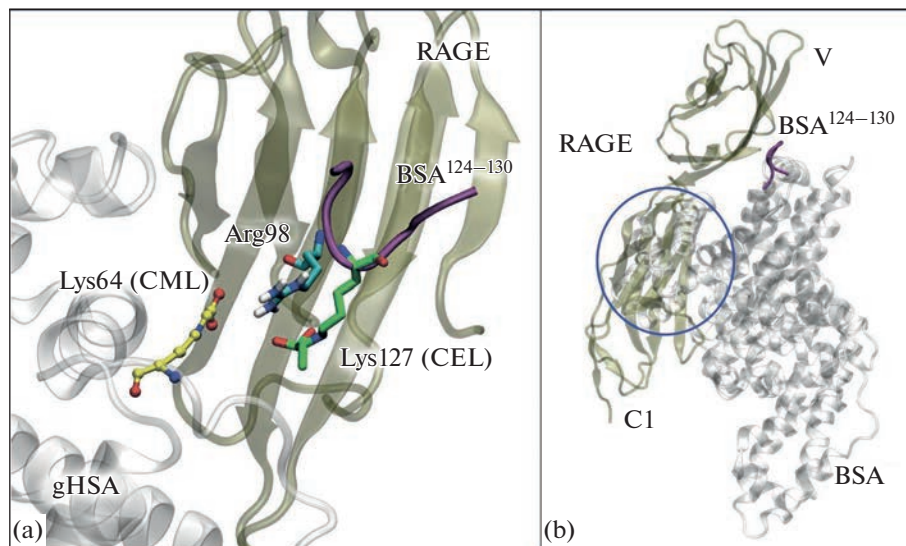


Рис. 6. Взаимодействие RAGE с гликированными лизинами в составе белков и пептидов по данным *in silico* и *in vitro*.

(а) — выравнивание комплекса V-домена с gHSA, гликированным по Lys64, полученного *in silico* в представленной работе, и комплекса V-домена с Lys127-гликированным фрагментом бычьего сывороточного альбумина (аминокислотные остатки 124–130, BSA^{124–130}), полученного методом ЯМР [48]. Атомы углерода CML gHSA и карбоксиэтил-лизина (CEL) BSA^{124–130} выделены желтым и зеленым цветом соответственно. Остов gHSA, V-домен RAGE и пептид BSA^{124–130} показаны серой, коричневой и фиолетовой лентой соответственно. Второстепенные атомы водорода не показаны для четкости рисунка.

(б) — выравнивание структур комплекса V-домена RAGE с BSA^{124–130} [48], полной молекулы BSA [49] и VC1-доменами RAGE [30]. Остов BSA, V-домен RAGE и пептид BSA^{124–130} показаны серой, коричневой и фиолетовой лентой соответственно. Символами V и C1 обозначены V- и C1-домены RAGE соответственно. Перекрытие BSA и C1-домена обведено синим цветом.

другом) [50]. Установлено, что гликирование снижает аффинность альбумина к лигандам сайтов Садлоу I и II [51] и к жирным кислотам [52–55]. Будет ли связывание gHSA с RAGE и sRAGE еще больше менять его связывающую активность, остается невыясненным. С другой стороны, подверженность альбумина аллостерической модуляции может стать ключом к модуляции его взаимодействия с RAGE и sRAGE.

Таким образом, в представленном исследовании мы изучили механизм взаимодействия гликированного альбумина с RAGE, выявили мажорные и минорные сайты взаимодействия. Новая информация о взаимодействии gHSA с RAGE поможет понять роль альбумина в патофизиологии СД и сопутствующих заболеваний и продвинуться на пути создания эффективной патогенетической и симптоматической терапии, а также профилактики этой патологии.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основные ограничения представленной работы связаны с несовершенством оценочных функций макромолекулярного докинга. В нашей работе мы использо-

вали программу ZDOCK, авторы которой регулярно публикуют отчеты критической оценки прогнозируемых взаимодействий (reports of critical assessment of predicted interactions, CAPRI reports) [56–58]. Согласно публикуемым отчетам, часть белок–белковых комплексов предсказывается неправильно [58]. Таким образом, про полученные в нашей работе комплексы gHSA-RAGE мы можем утверждать, что это лишь возможные конформации комплексов. Из стека полученных конформаций мы отбирали наиболее вероятные по оценочной функции ZDOCK, а дополнительным критерием отбора служили экспериментальные данные Xie и соавт. [17] об участках RAGE, взаимодействующих с CML в составе пептидов и BSA. Кроме того, стабильность комплексов мы проверяли методом МД. Тем не менее, не исключено, что реальная конформация gHSA-RAGE не соответствует наиболее вероятной по оценочной функции ZDOCK. При этом важно понимать, что никакая другая программа не обладает 100%-ной предсказательной способностью, так что в будущем представляется разумным рассмотреть менее вероятные конформации из числа тех, в которых CML взаимодействует с IS, а также провести сравнительный анализ с применением других программ для макромолекулярного докинга. Из ограничений представленной работы можно также отметить, что мы рассмотрели только 10 остатков лизина из 59 и исследовали только один тип гликирования (карбоксиметил-лизины). Пока что неизученным остается механизм взаимодействия других видов gHSA (карбоксиэтил-лизинов, глиоксаль-лизин-амидов, карбоксиметил-аргининов и др.) с RAGE. Это входит в задачи наших ближайших исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00155).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.А.Б. и Н.В.Г.), проведение вычислительного эксперимента (Д.А.Б.), написание и редактирование манускрипта (Д.А.Б. и Н.В.Г.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Расчетные эксперименты проводили с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gounden V, Ngu M, Anastasopoulou C, Jialal I (2020) Fructosamine. In: Stat Pearls. StatPearls Publ. Treasure Island (FL).
2. Vlassopoulos A, Lean MEJ, Combet E (2013) Role of oxidative stress in physiological albumin glycation: A neglected interaction. Free Radic Biol Med 60: 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.010>
3. Belsare S, Coté G (2021) Development of a colorimetric paper fluidic dipstick assay for measurement of glycated albumin to monitor gestational diabetes at the point-of-care. Talanta

- 223(Pt 1): 121728.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121728>
4. Bettiga A, Fiorio F, Di Marco F, Trevisani F, Romani A, Porrini E, Salonia A, Montorsi F, Vago R (2019) The modern western diet rich in advanced glycation end-products (AGEs): An overview of its impact on obesity and early progression of renal pathology. *Nutrients* 11(8): 1748.
<https://doi.org/10.3390/nu11081748>
 5. Fritz G (2011) RAGE: A single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci* 36: 625–632.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.08.008>
 6. Гаврилова АО, Северина АС, Шамхалова МШ, Шестакова МВ (2021) Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе диабетической нефропатии. *Сахарный диабет* 24(5): 461–469. [Gavrilova AO, Severina AS, Shamkhalova MSH, Shestakova MV (2021) The role of advanced glycation end products in patogenesis of diabetic nephropathy. *Sakharnyy Diabet* 24(5): 461–469. (In Russ)].
<https://doi.org/10.14341/DM12784>
 7. Gill V, Kumar V, Singh K, Kumar A, Kim JJ (2019) Advanced glycation end products (AGEs) may be a striking link between modern diet and health. *Biomolecules* 9(12): 888.
<https://doi.org/10.3390/biom9120888>
 8. Smith PK (2017) Do advanced glycation end-products cause food allergy? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 17: 325–331.
<https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000385>
 9. Sukkar MB, Wood LG, Tooze M, Simpson JL, McDonald VM, Gibson PG, Wark PAB (2012) Soluble RAGE is deficient in neutrophilic asthma and COPD. *Eur Respir J* 39: 721–729.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00022011>
 10. Gutowska K, Czajkowski K, Kuryłowicz A (2023) Receptor for the Advanced Glycation End Products (RAGE) Pathway in Adipose Tissue Metabolism. *Int J Mol Sci* 24(13): 10982.
<https://doi.org/10.3390/ijms241310982>
 11. Morales ME, Rojas RA, Monasterio AV, González BI, Figueroa CI, Manques M B, Romero EJ, Llanos LJ, Valdés ME, Cofré LC (2013) Lesiones gástricas en pacientes infectados con *Helicobacter pylori*: Expresión de RAGE (receptor de productos de glicosilización avanzada) y otros inmunomarcadores. *Rev Med Chil* 141: 1240–1248.
<https://doi.org/10.4067/S0034-98872013001000002>
 12. Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, Notari S, Ascenzi P (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life* 57(12): 787–796.
<https://doi.org/10.1080/15216540500404093>
 13. van der Vusse GJ (2009) Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet* 24(4): 300–307.
<https://doi.org/10.2133/dmpk.24.300>
 14. Giglio RV, Lo Sasso B, Agnello L, Bivona G, Maniscalco R, Ligi D, Mannello F, Ciaccio M (2020) Recent Updates and Advances in the Use of Glycated Albumin for the Diagnosis and Monitoring of Diabetes and Renal, Cerebro- and Cardio-Metabolic Diseases. *J Clin Med* 9: 3634.
<https://doi.org/10.3390/jcm9113634>
 15. Arasteh A, Farahi S, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi AA (2014) Glycated albumin: an overview of the In Vitro models of an In Vivo potential disease marker. *J Diabetes Metab Disord* 13: 49.
<https://doi.org/10.1186/2251-6581-13-49>
 16. Qiu HY, Hou NN, Shi JF, Liu YP, Kan CX, Han F, Sun XD (2021) Comprehensive overview of human serum albumin glycation in diabetes mellitus. *World J Diabetes* 12(7): 1057–1069.
<https://doi.org/10.4239/wjcd.v12.i7.1057>
 17. Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A (2008) Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* 283(40): 27255–27269.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M801622200>
 18. Tramarin A, Naldi M, Degani G, Lupu L, Wiegand P, Mazzolari A, Altomare A, Aldini G, Popolo L, Vistoli G, Przybylski M, Bartolini M (2020) Unveiling the molecular mechanisms underpinning biorecognition of early-glycated human serum albumin and receptor for advanced glycation end products. *Anal Bioanal Chem* 412(18): 4245–4259.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02674-w>
 19. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* 4(1): 17.
<https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
 20. Hein KL, Kragh-Hansen U, Morth JP, Jeppesen MD, Otzen D, Møller JV, Nissen P (2010) Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. *J Struct Biol* 171(3): 353–360.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.03.014>
 21. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM (1999) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands

- for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 274(44): 31740–31749.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31740>
22. *Yatime L, Andersen GR* (2013) Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products. *FEBS J* 280(24): 6556–6568.
<https://doi.org/10.1111/febs.12556>
23. *Mohan SK, Gupta AA, Yu C* (2013) Interaction of the S100A6 mutant (C3S) with the V domain of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Biochem Biophys Res Commun* 434(2): 328–333.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.049>
24. *Humphrey W, Dalke A, Schulten K* (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 28–33.
[https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
25. *Ansari NA, Moinuddin, Ali R* (2011) Glycated lysine residues: a marker for non-enzymatic protein glycation in age-related diseases. *Dis Markers* 30(6): 317–324.
<https://doi.org/10.3233/DMA-2011-0791>
26. *Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E* (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2: 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
27. *Trott O, Olson AJ* (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem* 31(2): 455–461.
<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
28. *Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, Kim BH, Vreven T, Weng Z* (2014) ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics* 30(12): 1771–1773.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu097>
29. *Pierce BG, Hourai Y, Weng Z* (2011) Accelerating protein docking in ZDOCK using an advanced 3D convolution library. *PLoS One* 6(9): e24657.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024657>
30. *Sirois CM, Jin T, Miller AL, Bertheloot D, Nakamura H, Horvath GL, Mian A, Jiang J, Schrum J, Bossaller L, Pelka K, Garbi N, Brewah Y, Tian J, Chang C, Chowdhury PS, Sims GP, Kolbeck R, Coyle AJ, Humbles AA, Xiao TS, Latz E* (2013) RAGE is a nucleic acid receptor that promotes inflammatory responses to DNA. *J Exp Med* 210(11): 2447–2463.
<https://doi.org/10.1084/jem.20120201>
31. *Foloppe N, MacKerell AD Jr* (2000) All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J Comput Chem* 21: 86–104.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(20000130\)21:2%3C86::AID-JCC2%3E3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(20000130)21:2%3C86::AID-JCC2%3E3.0.CO;2-G)
32. *Jorgensen WL* (1981) Quantum and statistical mechanical studies of liquids. 10. Transferable intermolecular potential functions for water, alcohols, and ethers. Application to liquid water. *J Am Chem Soc* 103(2): 335–340.
<https://doi.org/10.1021/ja00392a016>
33. *Bussi G, Zykova-Timan T, Parrinello M* (2009) Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling. *J Chem Phys* 130(7): 074101.
<https://doi.org/10.1063/1.3073889>
34. *Parrinello M, Rahman A* (1980) Crystal Structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics Study. *Phys Rev Lett* 45: 1196–1199.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.45.1196>
35. *Darden T, York D, Pedersen L* (1993) Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 3: 10089–10092.
<https://doi.org/10.1063/1.464397>
36. *Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM* (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comp Chem* 18: 1463–1473.
37. *Sartore G, Bassani D, Ragazzi E, Traldi P, Lapolla A, Moro S* (2021) In silico evaluation of the interaction between ACE2 and SARS-CoV-2 Spike protein in a hyperglycemic environment. *Sci Rep* 11(1): 22860.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-02297-w>
38. *Penumutthu SR, Chou RH, Yu C* (2014) Structural insights into calcium-bound S100P and the V domain of the RAGE complex. *PLoS One* 2014 9(8): e103947.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103947>
39. *Sand KM, Bern M, Nilsen J, Noordzij HT, Sandlie I, Andersen JT* (2015) Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics. *Front Immunol* 5: 682.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00682>

40. Wu D, Gucwa M, Czub MP, Cooper DR, Shabalin IG, Fritzen R, Arya S, Schwarz-Linek U, Blingdauer CA, Minor W, Stewart AJ (2023) Structural and biochemical characterisation of Co^{2+} -binding sites on serum albumins and their interplay with fatty acids. *Chem Sci* 14(23): 6244–6258.
<https://doi.org/10.1039/d3sc01723k>
41. Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, Brett J, Cao R, Kuwabara K, Costache G, Simionescu N, Simionescu M, Stern D (1994) Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19): 8807–8811.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8807>
42. Chen CY, Abell AM, Moon YS, Kim KH (2012) An advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGEs (RAGE) axis restores adipogenic potential of senescent preadipocytes through modulation of p53 protein function. *J Biol Chem* 287(53): 44498–44507.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399790>
43. Belinskaia DA, Voronina PA, Shmurak VI, Jenkins RO, Goncharov NV (2021) Serum Albumin in Health and Disease: Esterase, Antioxidant, Transporting and Signaling Properties. *Int J Mol Sci* 22(19): 10318.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910318>
44. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2001) The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 108(7): 949–955.
<https://doi.org/10.1172/JCI14002>
45. Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Kurita-Nakamura Y, Matsui T, Yoshida T, Imaizumi T (2007) Serum levels of sRAGE, the soluble form of receptor for advanced glycation end products, are associated with inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *Mol Med* 13(3–4): 185–189.
<https://doi.org/10.2119/2006-00090>
46. Steenbeke M, De Bruyne S, De Buyzere M, Lapauw B, Speeckaert R, Petrovic M, Delanghe JR, Speeckaert MM (2021) The role of soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) in the general population and patients with diabetes mellitus with a focus on renal function and overall outcome. *Crit Rev Clin Lab Sci* 58(2): 113–130.
<https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1791045>
47. UniProt Consortium (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47(D1): D506–D515.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
48. Xue J, Rai V, Singer D, Chabierski S, Xie J, Reverdatto S, Burz DS, Schmidt AM, Hoffmann R, Shekhtman A (2011) Advanced glycation end product recognition by the receptor for AGEs. *Structure* 19(5): 722–732.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2011.02.013>
49. Castagna R, Donini S, Colnago P, Serafini A, Parisini E, Bertarelli C (2019) Biohybrid Electrospun Membrane for the Filtration of Ketoprofen Drug from Water. *ACS Omega* 4(8): 13270–13278.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01442>
50. Ascenzi P, Fasano M (2010) Allosteric in a monomeric protein: the case of human serum albumin. *Biophys Chem* 148(1–3): 16–22.
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2010.03.001>
51. Baraka-Vidot J, Guerin-Dubourg A, Bourdon E, Rondeau P (2012) Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin. *Biochimie* 94(9): 1960–1967.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.05.017>
52. Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF (1984) Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 259(6): 3812–3817.
53. Yamazaki E, Inagaki M, Kurita O, Inoue T (2005) Kinetics of fatty acid binding ability of glycated human serum albumin. *J Biosci* 30(4): 475–481.
<https://doi.org/10.1007/BF02703721>
54. Blache D, Bourdon E, Salloigne P, Lucchi G, Ducoroy P, Petit JM, Verges B, Lagrost L (2015) Glycated albumin with loss of fatty acid binding capacity contributes to enhanced arachidonate oxygenation and platelet hyperactivity: relevance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 64(3): 960–972.
<https://doi.org/10.2337/db14-0879>
55. Henning C, Stübner C, Arabi SH, Reichenwallner J, Hinderberger D, Fiedler R, Girndt M, Di Sanzo S, Ori A, Glomb MA (2022) Glycation Alters the Fatty Acid Binding Capacity of Human Serum Albumin. *J Agric Food Chem* 70(9): 3033–3046.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07218>
56. Vreven T, Pierce BG, Hwang H, Weng Z (2013) Performance of ZDOCK in CAPRI rounds 20–26. *Proteins* 81(12): 2175–2182.
<https://doi.org/10.1002/prot.24432>

57. Vreven T, Pierce BG, Borrmann TM, Weng Z (2017) Performance of ZDOCK and IRAD in CAPRI rounds 28–34. *Proteins* 85(3): 408–416.
<https://doi.org/10.1002/prot.25186>
58. Vreven T, Vangaveti S, Borrmann TM, Gaines JC, Weng Z (2020) Performance of ZDOCK and IRAD in CAPRI rounds 39–45. *Proteins* 88(8): 1050–1054.
<https://doi.org/10.1002/prot.25873>

Interaction of Glycated Albumin with Receptor for Glycation End Products According to Molecular Modeling Data

D. A. Belinskaia^{a, *} and N. V. Goncharov^{a, b}

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

^b*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Leningradsky Region, p.o. Kuz'molovsky, Russia*

*e-mail: d_belinskaya@mail.ru

In diabetes mellitus (DM) patients, the accumulation of advanced glycation end products (AGE) leads to inflammation and oxidative stress through the activation of specific receptors for AGE (RAGE). Glycated albumin (gHSA) makes a significant contribution to the overall level of AGE in human body and, as a result, to the pathogenesis of DM and concomitant diseases. The mechanism of interaction of gHSA with RAGE is practically not studied. The purpose of the present paper is to study the binding of gHSA to RAGE using molecular modeling methods, to find the main sites of interaction and structural features of glycation sites that determine the efficiency of complex formation with RAGE. Ten gHSA models were constructed using molecular docking and molecular dynamics (MD) methods; each model corresponded to one modified lysine residue (carboxymethyl-lysine): Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys525, Lys573, Lys574. Complexes of gHSA with the V-domain of RAGE were constructed using the macromolecular docking method, and their stability was studied using MD simulation. In the constructed gHSA models, the carboxyl groups of glycated Lys317 and Lys525 form intramolecular salt bridges with surrounding amino acids; in other cases, the carboxyl groups of the modified lysines are free to interact with positively charged amino acid residues on the RAGE surface. According to the macromolecular docking data and subsequent MD simulation, the complex of RAGE with gHSA glycated at Lys233 is most effective in terms of strength and specificity. Specific RAGE complexes with gHSA glycated at Lys317 and Lys574 are not formed. The obtained data on the interaction of gHSA with RAGE will help to understand the role of albumin in the pathophysiology of DM and advance towards the prevention and development of effective therapy for this disease.

Keywords: diabetes mellitus, glycated albumin, carboxymethyl-lysine, receptor for advanced glycation end products, fatty acids, molecular modeling

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**РОЛЬ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ
ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ КРЫС ПРИ СЕПСИСЕ**

© 2023 г. Г. И. Лобов*

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

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

Поступила в редакцию 01.10.2023 г.

После доработки 18.10.2023 г.

Принята к публикации 19.10.2023 г.

Лимфа, образуемая в тканях, обязательно проходит через лимфатические узлы (ЛУ), которые не только выполняют иммунную функцию, но и принимают участие в лимфотоке посредством ритмических высокоамплитудных сокращений. При воспалении в ЛУ экспрессируются несколько ферментов, продуцирующих сигнальные молекулы, обладающие релаксирующим эффектом. В данном исследовании изучалась роль K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов в сепсис-индуцированном ремоделировании ЛУ. У крыс вызывали сепсис посредством операции лигирования-пункции слепой кишки. Через 12 и 24 ч извлекали брыжеечные ЛУ и исследовали их сократительную активность в миографе. K_{ATP} -каналы активировали пинацидилем и блокировали глибенкламидом. $ВК_{Ca}$ -каналы активировали NS 1619 и блокировали тетраэтиламмонием (ТЭА). Оценивали силу тонического сокращения ЛУ в условиях применения активаторов и блокаторов K^+ -каналов и ингибиторов индуцибельной NO-синтазы и растворимой гуанилатциклазы. ЛУ крыс с сепсисом имели низкий уровень тонуса при стандартном натяжении. Активатор K_{ATP} -каналов — пинацидил приводил к большей релаксации ЛУ крыс с сепсисом по сравнению с контрольной группой, а ингибитор — глибенкламид, вызывал сократительную реакцию. Пинацидил на фоне глибенкламида не приводил к достоверным изменениям тонуса ЛУ. Применение активатора $ВК_{Ca}$ -каналов приводило к расслаблению ЛУ, в ЛУ септических крыс эффект был более выраженным. ТЭА приводил к повышению тонуса ЛУ, ЛУ септических крыс реагировали на применение ТЭА большим сокращением. Мы пришли к заключению, что NO, продуцируемый экспрессированной iNOS, у животных с сепсисом прямо или опосредованно активирует в ЛУ K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналы гладкомышечных клеток капсулы. Блокатор K_{ATP} -каналов глибенкламид приводил к повышению тонуса ЛУ во всех группах крыс, при этом прирост тонуса в ЛУ крыс с сепсисом был достоверно большим по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы. Применение селективного активатора $ВК_{Ca}$ -каналов NS 1619 сопровождалось выраженной релаксацией ЛУ. В перспективе K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналы гладкомышечных клеток капсулы ЛУ могут явиться потенциальной мишенью для терапевтического воздействия с целью коррекции иммунного ответа посредством замедления или ускорения потока лимфы через ЛУ.

Ключевые слова: лимфатический узел, гладкомышечная клетка, сепсис, индуцибельная NO-синтаза, оксид азота, K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -канал

DOI: 10.31857/S0869813923120063, **EDN:** CQTUNH

ВВЕДЕНИЕ

Еще в конце XX века воспаление ассоциировалось в основном с инфекциями и травмами. Но данные последних десятилетий свидетельствуют о том, что воспали-

ние сопровождается самыми разнообразными патологическими процессами (атеросклероз, диабет, ожирение и др.) и является врожденным защитным механизмом организма не только от инфекционного, но и от неинфекционного патологического воздействия [1]. В конечном итоге воспаление обеспечивает выживание во время развития патологического процесса и поддерживает гомеостаз тканей в различных неблагоприятных условиях. Воспалительный процесс представляет собой каскад клеточных и микрососудистых реакций, которые служат для удаления поврежденной и создания новой ткани. Одним из первых признаков воспаления является увеличение проницаемости кровеносных сосудов, позволяющее крупномолекулярным компонентам плазмы и дендритным клеткам выходить из кровотока и накапливаться в поврежденной ткани [2]. В очаг воспаления привлекаются различные иммунные клетки, которые индуцируют продукцию сигнальных молекул, сопровождающих воспаление: провоспалительных цитокинов (TNF, IL-1, IL-6), хемокинов (CCL2 и CXCL8), газотрансмиттеров, липидных медиаторов, протеолитических ферментов и свободных радикалов [3]. Воспалительные макрофаги продуцируют в очаге воспаления большое количество активных форм кислорода и азота, которые являются эффективными средствами борьбы с патогенами, но также приводят к повреждению и гибели различных клеток в воспаленных тканях. Часть макрофагов также погибает в этой высокореактивной среде. В итоге в очаге воспаления накапливается множество различных сигнальных молекул и большое количество клеточного детрита, включающего фрагменты клеток ткани, макрофагов и бактериальных клеток [4]. Несмотря на повышенную проницаемость кровеносных сосудов в воспаленной ткани, крупные молекулы из очага воспаления поступают в лимфатические капилляры и удаляются из ткани лимфатическими сосудами [5], которые доставляют эти молекулы в дренирующие лимфатические узлы (ЛУ) [6].

Иммунные клетки и сигнальные молекулы, доставленные лимфой в ЛУ, взаимодействуют с различными клетками ЛУ: субкапсулярными макрофагами, эндотелиальными клетками лимфатических синусов и стромальными клетками. Результатом подобного взаимодействия является ремоделирование стромы и сосудистой сети ЛУ, расширение фибробластной ретикулярной сети и увеличение ЛУ в объеме до 20 раз [7]. Изменения, происходящие в строме и паренхиме ЛУ при воспалении, хорошо изучены [8]. В то же время данных об изменениях активной транспортной функции ЛУ при воспалении практически нет. Между тем одной из основополагающих функций ЛУ является их активная насосная функция [9]. В ряде исследований показано, что в физиологических условиях капсула ЛУ ритмично сокращается, что приводит к повышению давления в синусах ЛУ и выходу лимфы в выносящие ЛС [10, 11]. Активным элементом, обеспечивающим сокращения капсулы ЛУ, являются гладкомышечные клетки капсулы, плотно контактирующие друг с другом и функционирующие по принципу функционального синцития [12]. Установлено, что воспаление сопровождается экспрессией в капсуле ЛУ индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), циклооксигеназы-2 и цистатионин-γ-лиазы. Продуцируемые ими оксид азота (NO), простагландины и сероводород оказывают ингибирующее влияние на гладкомышечные клетки ЛУ, что приводит к угнетению фазных сокращений, снижению тонического напряжения и расслаблению капсулы [13, 14]. Механизмы ингибирующего действия этих сигнальных молекул на гладкомышечные клетки капсулы ЛУ изучены слабо. В то же время известно, что одним из механизмов ингибирования сократительной функции гладких мышц артерий в процессе развития воспалительного ответа является активация K^+ -каналов гладкомышечных клеток [15, 16]. Электрофизиологические и функциональные данные демонстрируют аномальную активацию K^+ -каналов в гладких мышцах кровеносных сосудов у животных с эндотоксическим шоком [17]. На мембране гладкомышечных

клеток лимфатических сосудов также найдено несколько видов K^+ -каналов, в т.ч. BK_{Ca} - и K_{ATP} -каналы [18, 19]. Доказано их участие в регуляции транспортной функции лимфатических сосудов при воспалении [20]. Роль K^+ -каналов на мембране гладких мышц капсулы ЛУ до настоящего времени не изучена, соответственно, нет данных об их участии в регуляции сократительной функции гладких мышц ЛУ при воспалении. Целью данного исследования являлось изучение роли BK_{Ca} - и K_{ATP} -каналов гладкомышечных клеток в ингибировании сократительной функции ЛУ при моделировании сепсиса у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было проведено на самцах крыс Wistar в возрасте 20 недель и массой 320–350 г из биобанка Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Крыс до эксперимента содержали в условиях вивария в помещении с регулируемой температурой 20–22°C и световом режиме 12 ч свет/12 ч темнота при свободном доступе к стандартному корму и питьевой воде. Перед исследованием животных случайным образом разделили на три группы: две опытных по 12 крыс и контрольную ($n = 10$). У всех крыс перед экспериментом измеряли артериальное давление (АД) с помощью аппарата “Систола” (“Нейроботикс”, Россия). Абдоминальный сепсис вызывали посредством лигирования-пункции слепой кишки (cecal ligation puncture, CLP). Под анестезией зоветилом (15 мг/кг, Vibrac, Франция) выбривали шерсть в нижней части живота и дезинфицировали кожу хлоргексидином (Южфарм, Россия). Выполняли срединный разрез брюшной стенки в нижней части живота длиной 2 см, слепую кишку извлекали из брюшной полости и размещали на стерильной салфетке. Затем перевязывали слепую кишку шелковой лигатурой на расстоянии 3 см от дистального конца и прокалывали лигированную часть кишки насквозь иглой 20G. После этого кишку аккуратно массировали до появления кишечного содержимого на поверхности кишки. Затем слепую кишку погружали в брюшную полость и зашивали разрез брюшной стенки. В контрольной группе оперативное вмешательство проводили по аналогичной схеме, но извлеченную из брюшной полости кишку не лигировали и не прокалывали. По завершении операции каждой крысе подкожно вводили по 3 мл теплого физиологического раствора, и с целью обезболивания в раннем послеоперационном периоде инфильтрировали область разреза 0.2%-ным раствором лидокаина (0.4 мл, Фармстандарт-Лексредства, Россия). Животных помещали в индивидуальные клетки с подогреваемым полом до полного восстановления от анестезии. Состояние крыс контролировали каждые 12 ч. Через 12 и 24 ч после CLP у крыс вновь измеряли АД.

Брыжеечные ЛУ забирали у крыс через 12 и 24 ч после операции CLP. Под общей анестезией зоветилом вскрывали брюшную полость и извлекали 2–3 брыжеечных ЛУ, после чего животных выводили из эксперимента посредством обескровливания (разрез нижней полой вены). До исследования ЛУ хранили в холодильнике на льду в физиологическом солевом растворе (PSS). Перед исследованием у ЛУ удаляли основную массу перинодального жира и окружающую соединительную ткань. Размеры ЛУ определяли под микроскопом МССО (“ЛОМО”) с измерительным окуляром. К полюсам ЛУ фиксировали шелковые лигатуры. ЛУ помещали в камеру миографа, через которую постоянно протекал физиологический солевой раствор (PSS), содержащий (в mM) 120.4 NaCl, 5.9 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 15.5 NaHCO₃, 11.5 глюкозы (все вещества химически чистые, производства “Химпром”) и 10 г/л очищенного бычьего сывороточного альбумина (Merck, Sigma-Aldrich). Раствор барботировали газовой смесью, состоящей из 95% O₂ и 5% CO₂. Температуру раствора поддерживали на уровне 38 ± 0.1°C, pH 7.40 ± 0.02;

термометр Testo 103 (Testo SE & Co., Германия, рН-метр Hanna HI 83141 (HANNA Instruments, Германия). С помощью лигатур ЛУ прикрепляли к датчику силы FORT-10 (WPI, США) и микроманипулятору.

Сигнал от датчика подавали на вход усилителя INA333 (Texas Instruments Incorporated, США), далее — в сигма-дельта АЦП, встроенный в микроконтроллер STM32F373 (STMicroelectronics, Франция). Затем поток данных с частотой 50 Гц поступал на USB-порт компьютера. Полученные данные обрабатывали программой регистрации, разработанной в Институте экспериментальной медицины, которая обеспечивала непрерывную запись информации с датчика на протяжении всего эксперимента.

Помимо вышеуказанных химических веществ, в данном исследовании использовали следующие реактивы (все — производства Sigma Aldrich-Merck (Германия): 1400W (N-([3-(Aminomethyl)phenyl] methyl)ethanimidamide dihydrochloride), 20 мкМ; ODQ (1H-1,2,4 Oxadiazolo 4,3-a quinoxalin-1-one), 10 мкМ; пинацидил (Pinacidil monohydrate), 10 мкМ; глибенкламид (Glibenclamide), 10 мкМ; NS 1619 (1,3-Dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-one), 1 мкМ; тетраэтиламмоний хлорид, ТЭА (Tetramethyl-d12-ammonium chloride), 1–10 мМ.

Реактивы растворяли в PSS непосредственно перед каждым экспериментом. ODQ, NS 1619, пинацидил и глибенкламид предварительно растворяли в DMSO (Servicebio Technology, Китай) и перед экспериментом добавляли необходимое количество концентрата в физиологический раствор. DMSO в разведении 1 : 1000 не вызывал значимых изменений параметров сократительной активности ЛУ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программах MS Excel 2010 (Microsoft Corp., США) и InStat 3.1 (GraphPad Software, США). Нормальность распределения полученных данных определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены в виде среднего арифметического значения $\pm$ стандартная ошибка ($M \pm SE$). Для сравнения данных использовали *t*-критерий Стьюдента для непарных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В процессе исследования через 12 и 24 ч после операции у всех CLP-крыс регистрировали признаки абдоминального сепсиса: учащенное поверхностное дыхание, пилоэрекция, сторбленность или съезживание в углу клетки, отказ от пищи. Наблюдалось значительное снижение систолического (САД) и диастолического (ДАД) давления (табл. 1). Через 24 ч одна крыса из группы CLP2 погибла.

При вскрытии брюшной полости крыс CLP обнаруживали кровянистую жидкость, гиперемию и отек кишечника. Брыжеечные ЛУ крыс CLP имели овальную форму, были темно-красного цвета, их размеры были в пределах: длина — 9–12 мм, ширина 6–7 мм. Различий в размерах ЛУ в группах CLP1 и CLP2 не было выявлено, при этом ЛУ крыс CLP2 выглядели более темными и отечными. ЛУ крыс контрольной группы были бледно-розового цвета, имели преимущественно овальную форму, их длина была около 6–7 мм, ширина — 3–4 мм.

После 30-минутного выдерживания в камере миографа с проточным PSS ЛУ подвергали натяжению, соответствующему трансмуральному давлению 4 см водн. ст. На протяжении последующих 1–2 мин наблюдали релаксацию ЛУ и установление стабильного уровня тонуса. Средний уровень тонуса ЛУ в контрольной группе составил 1.23 ± 0.14 мН, в группе CLP1 — 0.73 ± 0.08 мН, в группе CLP2 — 0.67 ± 0.06 мН. ЛУ крыс контрольной группы генерировали спонтанные фазные сокращения со

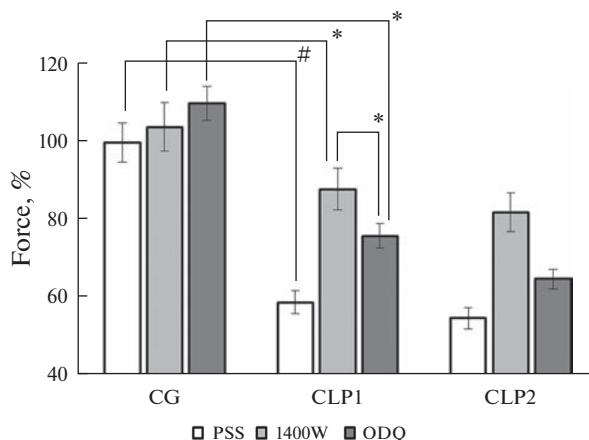


Рис. 1. Тонус лимфатических узлов крыс при действии 1400W и ODQ. Тонус лимфатических узлов крыс контрольной группы в физиологическом растворе (CG) принят за 100%. CLP1 – лимфатические узлы крыс через 12 ч после операции, CLP2 – лимфатические узлы крыс через 24 ч после операции. Различия достоверны: * – $p < 0.05$, # – $p < 0.01$.

средней частотой $0.82 \pm 0.15 \text{ мин}^{-1}$ и амплитудой $0.38 \pm 0.08 \text{ мН}$. В ЛУ крыс CLP фазных сокращений не было зарегистрировано.

Ранее нами было показано, что основной сигнальной молекулой, образующейся в ЛУ при воспалении и приводящей к релаксации капсулы ЛУ, является NO, продуцируемый iNOS [14]. В данном исследовании мы также оценивали величину NO-опосредованной релаксации ЛУ крыс CLP. 1400W практически не оказывал влияния на тонус ЛУ крыс контрольной группы, а в ЛУ групп CLP1 и CLP2 приводил к значительному повышению тонуса (рис. 1).

Сигнальный каскад $\text{NO} \rightarrow \text{sGC} \rightarrow \text{cGMP}$ регулирует различные физиологические процессы, включая расслабление гладких мышц кровеносных сосудов [21]. Расслабляющий эффект эта сигнальная цепочка оказывает и на лимфатические сосуды и ЛУ [22]. Исходя из этого, мы провели серию экспериментов с ингибированием растворимой гуанилатциклазы. ODQ оказывал слабое влияние на тонус ЛУ крыс контрольной группы, но приводил к значительному повышению тонуса ЛУ крыс CLP1 и CLP2. Необходимо отметить, что в обеих группах крыс CLP повышение тонуса ЛУ под влиянием ODQ было достоверно меньше по сравнению с эффектом 1400W.

Таблица 1. Артериальное давление у крыс

Группы крыс	Исходное АД (мм рт. ст.)		АД через 12 ч (мм рт. ст.)		АД через 24 ч (мм рт. ст.)	
	САД	ДАД	САД	ДАД	САД	ДАД
CLP1	118 ± 7	78 ± 5	$89 \pm 5^*$	$60 \pm 4^*$	—	—
CLP2	121 ± 8	81 ± 6	$84 \pm 4^*$	$53 \pm 4^*$	$77 \pm 5^*$	$51 \pm 5^*$
CG	119 ± 6	79 ± 6	121 ± 8	77 ± 6	122 ± 8	81 ± 6

CLP1 – группа крыс, ЛУ которых исследовали через 12 ч после CLP, CLP2 – группа крыс, ЛУ которых исследовали через 24 ч после CLP, CG – контрольная группа крыс; различия САД и ДАД в группах CLP и CG достоверны, * – $p < 0.01$.

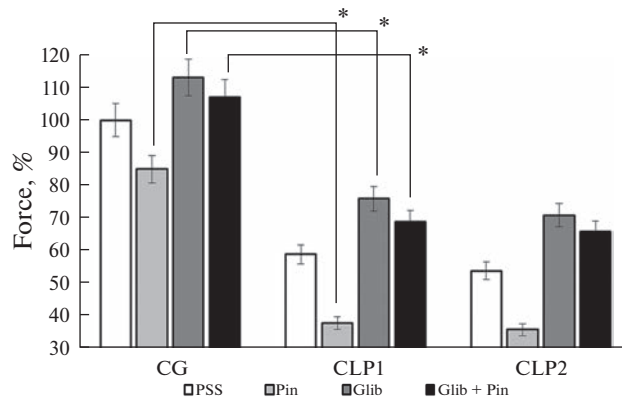


Рис. 2. Тонус лимфатических узлов крыс при действии активатора и блокатора K_{ATP} -каналов. Тонус лимфатических узлов крыс контрольной группы в физиологическом растворе (CG) принят за 100%. CLP1 – лимфатические узлы крыс через 12 ч после операции, CLP2 – лимфатические узлы крыс через 24 ч после операции. Pin – пинацидил, Glib – глибенкламид. Различия достоверны: * – $p < 0.01$.

Конечным звеном сигнальной цепочки $NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow K_{ATP}$ -каналы являются K_{ATP} -каналы. Применение пинацидила приводило к релаксации ЛУ всех групп, при этом амплитуда релаксации ЛУ крыс CLP1 и CLP2 была достоверно выше по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы (рис. 2). После удаления пинацидила и восстановления ЛУ в камеру миографа добавляли глибенкламид, являющийся блокатором K_{ATP} -каналов. Поскольку блокирование K_{ATP} -каналов глибенкламидом происходит медленно, для возникновения максимального блока требовалось до 15 мин [23]. Через 15 мин оценивали тонус ЛУ, который во всех группах ЛУ значительно повысился. Затем на фоне действия глибенкламида в раствор добавляли пинацидил. На фоне глибенкламида пинацидил вызывал слабую релаксацию ЛУ всех групп крыс.

Сепсис представляет собой довольно сложное состояние организма, в его развитие вовлекаются различные системы и различные сигнальные цепочки [24]. В частности, известно, что при септическом шоке состояние гипотонии поддерживается также за счет сверхактивации BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток артерий [25]. Исходя из этих данных, с учетом того факта, что BK_{Ca} -каналы обнаружены в гладкомышечных клетках лимфатических сосудов, в следующей серии опытов мы исследовали возможное участие BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток капсулы в сепсис-индуцированной релаксации ЛУ. В омывающий раствор добавляли ТЭА в нарастающих концентрациях (1, 3, 5, 10 мМ). Каждое очередное повышение концентрации ТЭА производили после установления стабильного уровня тонуса, вызванного предыдущей концентрацией ТЭА. ТЭА в изученных концентрациях приводил к повышению тонуса ЛУ, которое в ЛУ септических крыс было достоверно больше по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы. Максимальное повышение тонуса было зарегистрировано в ЛУ крыс CLP2.

После 30-минутного восстановления ЛУ исследовали их тонические реакции при добавлении в раствор NS 1619. Действие NS 1619 приводило к релаксации ЛУ, амплитуда релаксации ЛУ септических крыс была достоверно больше по сравнению с эффектом NS 1619 на ЛУ крыс контрольной группы. После завершения расслабления, вызванного NS 1619, в раствор, содержащий NS 1619, добавляли ТЭА в

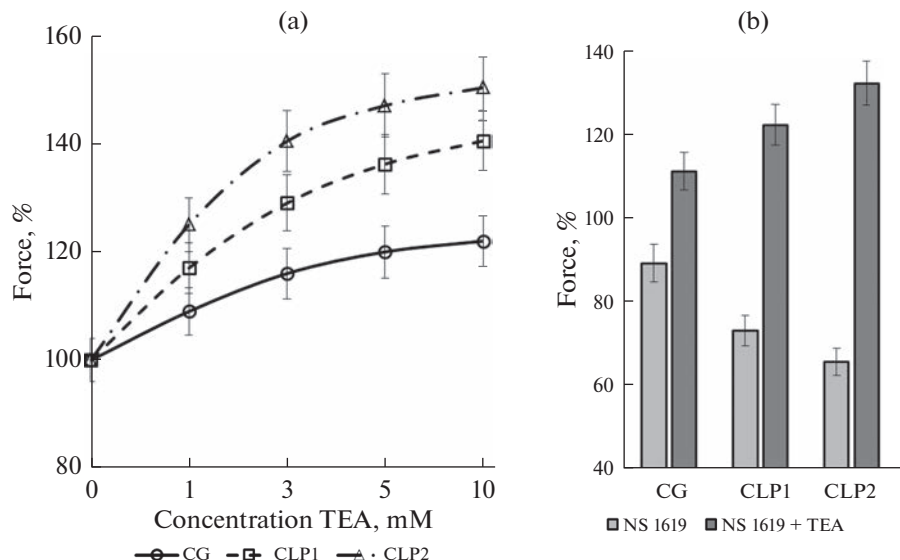


Рис. 3. Тонус лимфатических узлов крыс при действии блокатора и активатора BK_{Ca} -каналов. CG — лимфатические узлы крыс контрольной группы, CLP1 — лимфатические узлы крыс через 12 ч после операции, CLP2 — лимфатические узлы крыс через 24 ч после операции. (a) — зависимость тонуса лимфатических узлов крыс от концентрации ТЭА, (b) — тонус лимфатических узлов крыс при действии NS 1619 (1 мкМ) и тетраэтиламмония (ТЕА) (3 мМ). За 100% принимали исходную величину тонуса лимфатических узлов каждой группы в физиологическом растворе. Различия достоверны: * — $p < 0.01$.

концентрации 3 мМ. ТЭА в течение нескольких минут полностью нивелировал релаксирующий эффект NS 1619 и приводил к повышению тонуса ЛУ всех групп (рис. 3b).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сепсис является тяжелой формой воспалительного процесса, и его моделирование часто применяется в доклинической практике. Наиболее широко используемой клинической моделью сепсиса является лигирование и пункция слепой кишки, эта модель считается “золотым стандартом”, поскольку хорошо воссоздает гемодинамическую и метаболическую фазы сепсиса у человека [26]. Ремоделирование ЛУ обычно начинается с увеличения афферентного лимфатического притока и поступления в ЛУ активированных дендритных клеток и медиаторов воспаления. Вслед за этим происходит массивный приток иммунных клеток из системы кровообращения, а также пролиферация лимфоцитов. Затем к ремоделированию подключаются эндотелиальные и ретикулярные клетки стромального компартмента ЛУ [27]. Несмотря на то, что отдельные клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе ремоделирования ЛУ, раскрыты, некоторых деталей для полной картины этого сложного процесса явно не хватает. Капсула ЛУ является довольно жесткой и слабо растяжимой соединительнотканной структурой (по сравнению с паренхимой ЛУ), содержащей гладкомышечные клетки, и процессы, происходящие в капсуле при воспалении, важны для понимания механизмов регуляции потоков лимфы через ЛУ и формирования полного представления о процессе гипертрофии ЛУ. В нашем исследовании объем ЛУ крыс CLP через 24 ч после операции увеличивался в 4–5 раз.

В нескольких работах показано, что уже через 4–6 ч после индукции острого воспаления транспорт лимфы по лимфатическим сосудам нарушается, и основным эффектором ингибирования насосной функции лимфатических сосудов является NO [24, 28]. В нашей предыдущей работе при исследовании брыжеечных ЛУ быка, обработанных липополисахаридом, было установлено, что в воспаленных ЛУ экспрессируются различные ферменты, в т.ч. и те, которые продуцируют сигнальные молекулы, вызывающие релаксацию гладких мышц капсулы ЛУ – iNOS, цистатионин-γ-лиаза и циклооксигеназа 2 [14]. Позднее нами были получены примерно такие же данные при исследовании брыжеечных ЛУ крыс после лигирования-пункции слепой кишки [29]. Учитывая, что максимальный релаксирующий эффект на ЛУ был вызван NO, продуцируемым iNOS, в данном исследовании мы сконцентрировали внимание на механизмах действия NO на гладкомышечные клетки брыжеечных ЛУ крыс. Было подтверждено, что механические свойства ЛУ крыс CLP сильно изменяются по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы: после стандартного натяжения их тонус устанавливался на уровне 50–60% от соответствующего показателя ЛУ крыс контрольной группы, т.е. они становились более растяжимыми. С целью определения вклада NO в релаксацию ЛУ крыс CLP мы использовали высокоселективный ингибитор iNOS – 1400W, который значительно уменьшал сепсис-индуцированную релаксацию ЛУ крыс CLP (в среднем – на 30%). В данном исследовании мы не принимали во внимание NO, продуцируемый eNOS, поскольку iNOS образует NO, количество которого в десятки и сотни раз превышает количество этого газомедиатора, производимого eNOS. Также с учетом механизма действия 1400W в дальнейшем во всех заключениях в данной работе мы исходили из того, что в ЛУ септических крыс сигнальные цепочки активирует NO, продуцируемый iNOS. На основании данных наших экспериментов мы не можем идентифицировать клетки, экспрессирующие iNOS в ЛУ септических крыс. В этот процесс значительный вклад могут вносить иммунные клетки, поступившие при воспалении в ЛУ. В то же время на основании данных, полученных нами ранее при исследовании изолированных ЛПС-стимулированных полосок капсулы ЛУ [14], мы с достаточным основанием можем утверждать, что определенная часть iNOS экспрессируется клетками капсулы ЛУ. Применение ODQ приводило к значительному повышению тонуса ЛУ крыс CLP, при этом тоническое напряжение ЛУ крыс контрольной группы также достоверно повышалось, но в меньшей степени. Повышение тонуса ЛУ крыс контрольной группы при действии ODQ объясняется тем, что в физиологических условиях эндотелиоциты лимфатических сосудов и ЛУ непрерывно продуцируют небольшие количества NO, который активирует растворимую гуанилатциклазу (soluble guanylate cyclase, sGC) и таким образом способствует небольшому понижению тонуса [30–32]. ODQ блокирует стимулирующее действие NO на sGC, что приводит к повышению тонуса ЛУ. В ЛУ крыс CLP ODQ приводил к большему повышению тонуса ЛУ по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы, что, по нашему мнению, объясняется усиленной стимуляцией sGC, осуществляемой большим количеством NO, продуцируемым iNOS. Также значительное повышение тонуса ЛУ под влиянием ODQ можно объяснить сверхэкспрессией sGC в гладкомышечных клетках капсулы ЛУ, наблюдающейся при сепсисе, как, например, это было показано в ткани аорты и миокарде крыс [33].

Сравнение эффектов 1400W и ODQ на тонус ЛУ крыс CLP показывает, что 1400W оказывает достоверное большее влияние на сокращение гладкомышечных клеток капсулы ЛУ. Мы полагаем, что подобное различие эффектов ингибирования продукции NO и cGMP на тонус ЛУ объясняется сложными механизмами влияния NO на гладкомышечные клетки ЛУ. Известно, что NO в гладкомышечных клетках сосудов не только стимулирует sGC, но может влиять на клеточную активность независимо от активации sGC, например, стимулируя кальциевую АТФазу

саркоплазматического ретикулула, тем самым снижая внутриклеточную концентрацию кальция и вызывая расслабление гладких мышц [34]. Мы предполагаем, что в гладкомышечных клетках ЛУ при сепсисе могут активироваться и другие NO-опосредованные сигнальные цепочки, следствием чего является снижение концентрации цитоплазматического Ca^{2+} и расслабление гладкомышечных клеток.

Известно, что концентрация цитоплазматического Ca^{2+} является основным фактором, определяющим степень активации сократительных белков в гладкомышечных клетках, она зависит в основном от притока Ca^{2+} извне через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы. Их состояние определяется мембранным потенциалом, а последний — преимущественно градиентом концентрации K^+ , которая зависит от активности K^+ -каналов [35]. Все виды K^+ -каналов играют важную роль в поддержании мембранного потенциала в гладкомышечных клетках, а два из них: $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналы и ВК_{Ca} -каналы часто вовлекаются в различные патологические процессы, и их активация является основной причиной расслабления сосудистых гладкомышечных клеток и гипотонии при сепсисе [36].

Во многих публикациях показано, что $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналы гладкомышечных клеток артерий являются одной из основных мишеней сепсиса, имеющей решающее значение для развития тяжелой гипотонии [36]. Литературы о $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналах в лимфатических сосудах значительно меньше по сравнению с кровеносными сосудами, но почти вся она предполагает, что эти каналы фундаментально аналогичны каналам в гладких мышцах артерий и что их активация является негативным регулятором лимфатического транспорта [37]. Действие пинацидила на протяжении нескольких минут приводило к релаксации ЛУ крыс всех групп, при этом релаксация ЛУ крыс CLP была достоверно большей по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы.

Хотя до настоящего времени нет прямых доказательств наличия $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов в гладкомышечных клетках капсулы ЛУ, мы полагаем, что релаксация ЛУ крыс контрольной группы на применение пинацидила могла быть обусловлена лишь активацией $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов, поскольку пинацидил является достаточно селективным активатором $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов. Кроме того, лимфатические сосуды и ЛУ имеют общее происхождение [38], а $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналы ранее были обнаружены в гладкомышечных клетках лимфатических сосудов [39], и их активация способствовала прекращению спонтанных фазных сокращений и расслаблению лимфатических сосудов [40]. Небольшая релаксация ЛУ крыс контрольной группы на пинацидил, по нашему мнению, объясняется тем, что $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналы обычно имеют низкую активность в физиологических условиях, но активируются при патологии и, в частности, при сепсисе, что приводит к гиперполяризации и расслаблению гладкомышечных клеток [41]. Мы полагаем, что большая амплитуда релаксации ЛУ крыс CLP по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы была обусловлена сепсис-индуцированной сверхэкспрессией $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов в гладкомышечных клетках ЛУ. Ранее у морских свинок с TNBS-индуцированным илеитом в собирательных мезентериальных лимфатических сосудах, дренирующих подвздошную кишку, была выявлена выраженная экспрессия мРНК субъединиц, образующих $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналы [41].

Эффекты применения глибенкламида подтверждают важность $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов в ЛУ в физиологических условиях и при сепсисе. Глибенкламид приводил к повышению тонуса ЛУ во всех группах крыс, при этом прирост тонуса в ЛУ крыс CLP был достоверно большим по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы. Затем в раствор, содержащий глибенкламид, мы добавляли пинацидил. Пинацидил на фоне глибенкламида не приводил к достоверной релаксации ЛУ, как это было в опытах без применения глибенкламида, т.е. активатор $\text{K}_{\text{АТР}}$ -каналов оказался неспособ-

бен открыть K_{ATP} -каналы, заблокированные глибенкламидом. Таким образом, мы получили дополнительное подтверждение участия K_{ATP} -каналов в релаксации ЛУ как в физиологических условиях, так и при сепсисе. Наши данные не являются прямым доказательством сверхэкспрессии K_{ATP} -каналов в гладкомышечных клетках ЛУ при сепсисе, но на других объектах показано, что гипореактивность сосудов при сепсисе обусловлена не только увеличением количества открытых K_{ATP} -каналов, но и увеличением их числа на мембране гладкомышечных клеток за счет активации генов [42].

Второй вид калиевых каналов, роль которых в модуляции тонуса ЛУ мы изучали в данной работе — это Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca} -каналы). BK_{Ca} -каналы экспрессируются на плазматической мембране различных возбудимых и невозбудимых клеток, включая нервные и гладкомышечные, где они являются связующим звеном между мембранным потенциалом и внутриклеточной концентрацией Ca^{2+} . Они участвуют во многих клеточных функциях, таких как генерация потенциала действия (реполяризация), высвобождение нейромедиаторов, модуляция тонуса гладкомышечных клеток сосудов и дыхательных путей [43, 44]. Известно также, что BK_{Ca} -каналы вовлекаются в различные патологические процессы, так, например, их активность значительно снижена в артериях при диабете 2-го типа [45] и артериальной гипертензии [46].

BK_{Ca} -каналы в физиологических условиях управляются мембранным потенциалом и концентрацией цитоплазматического Ca^{2+} , при этом на BK_{Ca} -каналы оказывают выраженное влияние различные эндогенные вазодилататоры, и, в частности, активность каналов артерий модулирует NO [47]. В экспериментах на животных установлено, что во время септического шока сверхактивируются каналы K_{ATP} и BK_{Ca} , что ведет к развитию тяжелой гипотонии [48]. Показано, что BK_{Ca} -каналы экспрессируются в гладкомышечных клетках лимфатических сосудов мышей [49]. Они также обнаружены в грудном протоке человека [50]. Данных о BK_{Ca} -каналах в гладких мышцах капсулы ЛУ в литературе нет.

В наших экспериментах на начальном этапе в качестве блокатора BK_{Ca} -каналов мы использовали ТЭА в концентрациях 1–10 мМ (рис 3а). Известно, что ТЭА эффективно блокирует BK_{Ca} -каналы через внутреннюю или внешнюю сторону мембраны [51]. В концентрации 3 мМ ТЭА оказывал выраженный стимулирующий эффект на тонус ЛУ крыс всех групп. Такая концентрация ТЭА считается селективной для BK_{Ca} -каналов [52], поэтому в дальнейшем при исследовании BK_{Ca} -каналов ЛУ был использован ТЭА в этой концентрации. Действие ТЭА приводило к повышению тонуса ЛУ во всех исследуемых группах, при этом ЛУ септических крыс демонстрировали значительно больший прирост тонуса по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы. Также представляется интересным, что эффект ТЭА на ЛУ крыс группы CLP2 был более выраженным по сравнению с ЛУ крыс CLP1 (рис. 3).

В следующей серии экспериментов мы оценили влияние NS 1619 на тонус ЛУ. NS 1619 представляет собой селективный активатор BK_{Ca} -каналов [52] и широко применяется при исследовании функций гладких мышц [53]. Применение NS 1619 сопровождалось выраженной релаксацией ЛУ крыс всех групп. Расслабление ЛУ крыс CLP было более выраженным по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы, кроме того, релаксирующий эффект NS 1619 на ЛУ крыс группы CLP2 был достоверно большим по сравнению с ЛУ крыс CLP1 (рис 3b). Применение ТЭА на фоне продолжающегося действия NS 1619 сопровождалось быстрым повышением тонического напряжения ЛУ всех групп, максимальное повышение тонуса было зарегистрировано в ЛУ крыс CLP2.

Данные, полученные в экспериментах с применением блокатора и активатора BK_{Ca} -каналов, позволяют сделать заключение о том, что в брыжеечных ЛУ крыс в физиологических условиях экспрессируются BK_{Ca} -каналы, которые оказывают влияние на сократительную функцию гладкомышечных клеток капсулы ЛУ. Их активация или блокирование сопровождаются достоверными изменениями тонуса ЛУ: релаксацией или повышением тонуса соответственно. Достоверные различия в амплитудах сокращения или релаксации ЛУ крыс контрольной группы и крыс групп CLP1 и CLP2 являются доказательством (хотя и косвенным) сверхэкспрессии BK_{Ca} -каналов в гладкомышечных клетках капсулы ЛУ при сепсисе. Необходимо отметить, что сверхэкспрессия BK_{Ca} -каналов в гладкомышечных клетках капсулы ЛУ септических крыс продолжала нарастать по мере прогрессирования сепсиса (реакции ЛУ крыс группы CLP2 на применение блокатора или активатора BK_{Ca} -каналов были более выраженными по сравнению с ЛУ крыс группы CLP1). Мы не изучали сигнальные механизмы, посредством которых NO активирует BK_{Ca} -каналы гладкомышечных клеток ЛУ, но из литературы известно, что NO может активировать BK_{Ca} -каналы посредством фосфорилирования каналов или прямым, независимым от циклического цГМФ способом [54].

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что при моделировании сепсиса у крыс воспаление сопровождается увеличением растяжимости капсулы ЛУ, что способствует их ремоделированию и гипертрофии. Одним из механизмов, приводящих к релаксации капсулы ЛУ, является экспрессия в ЛУ индуцибельной NO-синтазы, продуцирующей значительные количества оксида азота. Синтез NO приводит к расслаблению гладкомышечных клеток капсулы ЛУ посредством сверхэкспрессии и активации двух видов K^+ -каналов: K_{ATP} - и BK_{Ca} -каналов. Блокатор K_{ATP} -каналов глибенкламид приводил к повышению тонуса ЛУ во всех группах крыс, при этом прирост тонуса в ЛУ крыс CLP был достоверно большим по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы. Применение селективного блокатора BK_{Ca} -каналов NS 1619 сопровождалось выраженной релаксацией ЛУ крыс всех групп. Расслабление ЛУ крыс CLP было более выраженным по сравнению с ЛУ крыс контрольной группы. В перспективе K_{ATP} - и BK_{Ca} -каналы гладкомышечных клеток капсулы ЛУ могут явиться потенциальной мишенью для терапевтического воздействия с целью коррекции иммунного ответа посредством замедления или ускорения потока лимфы через ЛУ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям этической комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, протокол № 02/10 от 14.02.2022 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-25-00108).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование и проведение экспериментов, обработка данных, написание и редактирование манускрипта (Г.И.Л.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Roe K* (2021) An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scand J Immunol* 93(2): e12970.
<https://doi.org/10.1111/sji.12970>
2. *Schmid-Schönbein GW* (2006) Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* 8: 93–131.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095708>
3. *Yeung YT, Aziz F, Guerrero-Castilla A, Arguelles S* (2018) Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. *Curr Pharm Des* 24(14): 1449–1484.
<https://doi.org/10.2174/1381612824666180327165604>
4. *Robinson N, Ganesan R, Hegedűs C, Kovács K, Kufer TA, Virág L* (2019) Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol* 26: 101239.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101239>
5. *Лобов ГИ* (2023) Иммунная функция лимфатической системы. *Успехи физиол наук* 54(3): 3–24 [*Lobov GI* (2023) Immune function of the lymphatic system. *Advanc Physiol Sci* 54(3): 3–24. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179823030049>
6. *Kesler CT, Liao S, Munn LL, Padera TP* (2013) Lymphatic vessels in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 5(1): 111–124.
<https://doi.org/10.1002/wsbm.1201>
7. *Thierry GR, Gentek R, Bajenoff M* (2019) Remodeling of reactive lymph nodes: Dynamics of stromal cells and underlying chemokine signaling. *Immunol Rev* 289(1): 42–61.
<https://doi.org/10.1111/imr.12750>
8. *Chang JE, Turley SJ* (2015) Stromal infrastructure of the lymph node and coordination of immunity. *Trends Immunol* 36(1): 30–39.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2014.11.003>
9. *Lobov GI, Pan'kova MN, Abdreshov SN* (2015) Transport function of the lymph nodes in young and old animals. *Adv Gerontol* 28(4): 681–686.
10. *Ikomi F, Kousai A, Ono N, Ohhashi T* (2002) Electrical stimulation-induced $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -adrenoceptors-mediated contractions of isolated canine lymph nodes. *Auton Neurosci* 96(2): 85–92.
[https://doi.org/10.1016/s1566-0702\(01\)00363-0](https://doi.org/10.1016/s1566-0702(01)00363-0)
11. *Lobov GI, Pan'kova MN* (2011) Mechanical properties of lymph node capsule. *Bull Exp Biol Med* 151(1): 5.
<https://doi.org/10.1007/s10517>
12. *Pastukhova IA* (1986) Myocytes of the inguinal lymph nodes. *Arkh Anat Gistol Embriol* 90(6): 32–37.
13. *Lobov GI* (2021) Role of Endogenous Hydrogen Sulfide in Relaxation of the Lymph Node Capsule in LPS induced Inflammation. *J Evol Biochem Physiol* 57(6): 1363–1372.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021060156>
14. *Lobov GI* (2022) Contractile Function of the Capsule of the Bovine Mesenteric Lymph Nodes at the Early Stage of Inflammation. *J Evol Biochem Physiol* 58(6): 2109–2123.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022060370>
15. *Gao Y, Yang Y, Guan Q, Pang X, Zhang H, Zeng D* (2010) IL-1 β modulate the Ca^{2+} -activated big-conductance K channels (BK) via reactive oxygen species in cultured rat aorta smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 338(1–2): 59–68.
<https://doi.org/10.1007/s11010-009-0338-4>
16. *Wu K, Zhao L, Wang Y, Liu P, Cheng S, Yang X, Wang Y, Zhu Y* (2023) Mechanism of large-conductance calcium-activated potassium channel involved in inflammatory response in sepsis. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 35(5): 469–475.
<https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121430-20220314-00240>
17. *Chen SJ, Wu CC, Yang SN, Lin CI, Yen MH* (2000) Abnormal activation of K^{+} channels in aortic smooth muscle of rats with endotoxic shock: electrophysiological and functional evidence. *Br J Pharmacol* 131(2): 213–222.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703564>
18. *Cotton KD, Hollywood MA, McHale NG, Thornbury KD* (1997) Outward currents in smooth muscle cells isolated from sheep mesenteric lymphatics. *J Physiol* 503 (Pt 1): 1–11.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.001bi.x>

19. von der Weid PY, Rehal S, Dyrda P, Lee S, Mathias R, Rahman M, Roizes S, Imtiaz MS (2012) Mechanisms of VIP-induced inhibition of the lymphatic vessel pump. *J Physiol* 590(11): 2677–2691.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230599>
20. Wu TF, Carati CJ, Macnaughton WK, von der Weid PY (2006) Contractile activity of lymphatic vessels is altered in the TNBS model of guinea pig ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(4): G566–G574.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00058.2006>
21. Groneberg D, Konig P, Wirth A, Offermanns S, Koesling D, Friebe A. (2010) Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation* 121: 401–409.
22. Zhang LM, Niu CY, Zhao ZG, Si YH, Zhang YP (2012) ATP-sensitive potassium channel involved in modulation of nitride oxide regulating contractile activity of isolated lymphatics from hemorrhagic shock rats. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 8: 457–460.
23. Meisheri KD, Khan SA, Martin JL (1993) Vascular pharmacology of ATP-sensitive K⁺ channels: Interactions between glyburide and K⁺ channel openers. *J Vasc Res* 30: 2–12.
24. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL (2016) Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16045.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45>
25. Cauwels A, Brouckaert P (2008) Critical role for small and large conductance calcium-dependent potassium channels in endotoxemia and TNF toxicity. *Shock* 29: 577–582.
<https://doi.org/10.1097/shk.0b013e31815071e9>
26. Garcia LF, Singh V, Mireles B, Dwivedi AK, Walker WE (2023) Common Variables That Influence Sepsis Mortality in Mice. *J Inflamm Res* 16: 1121–1134.
<https://doi.org/10.2147/JIR.S400115>
27. Dasoveanu DC, Shipman WD, Chia JJ, Chyou S, Lu TT (2016) Regulation of lymph node vascular-stromal compartment by dendritic cells. *Trends Immunol* 37: 764–777.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.013>
28. Aldrich MB, Sevic-Muraca EM (2013) Cytokines are systemic effectors of lymphatic function in acute inflammation. *Cytokine* 64(1): 362–369.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.05.015>
29. Косарева МЕ, Чивильдеев АВ, Лобов ГИ (2023) Сепсис-индуцированное ингибирование сократительной функции лимфатических узлов. *Бюл экспер биол мед* 176(9): 280–285. [Kosareva ME, Chivildeev AV, Lobov GI (2023) Sepsis-induced inhibition of contractile function of lymph nodes. *Bull Exp Biol Med* 176(9): 280–285. (In Russ)].
<https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-176-9-280-285>
30. Shirasawa Y, Ikomi F, Ohhashi T (2000) Physiological roles of endogenous nitric oxide in lymphatic pump activity of rat mesentery *in vivo*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(4): G551–G556.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.4.G551>
31. von der Weid PY, Zhao J, Van Helden DF (2001) Nitric oxide decreases pacemaker activity in lymphatic vessels of guinea pig mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(6): H2707–H2716.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2707>
32. Лобов ГИ, Панькова МН (2010) NO-зависимая модуляция сократительной функции гладких мышц капсулы лимфатических узлов. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 96(5): 489–497. [Lobov GI, Pan'kova MN (2010) NO-dependent modulation of the contractile function of smooth muscles of the lymph node capsule. *Russ J Physiol* 96(5): 489–497. (In Russ)].
33. Fernandes D, Sordi R, Pacheco LK, Nardi GM, Heckert BT, Villela CG, Lobo AR, Barja-Fidalgo C, Assreuy J (2009) Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. *J Pharmacol Exp Ther* 328(3): 991–999.
<https://doi.org/10.1124/jpet.108.142034>
34. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, Cohen RA (2004) S-Glu-tathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med* 10(11): 1200–1207.
<https://doi.org/10.1038/nm1119>
35. Zhao YJ, Wang J, Rubin LJ, Yuan XJ (1997) Inhibition of K(V) and K(Ca) channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. *Am J Physiol* 272(2 Pt 2): H904–H912.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.2.H904>
36. Buckley JF, Singer M, Clapp LH (2006) Role of K_{ATP} channels in sepsis. *Cardiovasc Res* 72(2): 220–230.
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.07.011>
37. Davis MJ, Kim HJ, Nichols CG (2022) K_{ATP} channels in lymphatic function. *Am J Physiol Cell Physiol* 323(4): C1018–C1035.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00137.2022>

38. *van de Pavert SA, Mebius RE* (2014) Development of secondary lymphoid organs in relation to lymphatic vasculature. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 214: 81–91.
https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1646-3_7
39. *von der Weid PY* (1998) ATP-sensitive K^+ channels in smooth muscle cells of guinea-pig mesenteric lymphatics: role in nitric oxide and beta-adrenoceptor agonist-induced hyperpolarizations. *Br J Pharmacol* 125(1): 17–22.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702026>
40. *Garner BR, Stolarz AJ, Stuckey D, Sarimollaoglu M, Liu Y, Palade PT, Rusch NJ, Mu S* (2021) K_{ATP} Channel Openers Inhibit Lymphatic Contractions and Lymph Flow as a Possible Mechanism of Peripheral Edema. *J Pharmacol Exp Ther* 376(1): 40–50.
<https://doi.org/10.1124/jpet.120.000121>
41. *Mathias R, von der Weid PY* (2013) Involvement of the NO-cGMP- K_{ATP} channel pathway in the mesenteric lymphatic pump dysfunction observed in the guinea pig model of TNBS-induced ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304(6): G623–G634.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00392.2012>
42. *Shi W, Cui N, Wu Z, Yang Y, Zhang S, Gai H, Zhu D, Jiang C* (2009) Lipopolysaccharides up-regulate Kir6.1/SUR2B channel expression and enhance vascular K_{ATP} channel activity via NF-kappaB-dependent signaling. *J Biol Chem* 285: 3021–3029.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058313>
43. *Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST* (2006) Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110(1): 103–116.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.10.007>
44. *Hu XQ, Zhang L* (2012) Function and regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today* 17: 974–987.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.04.002>
45. *Wang Y, Zhang HT, Su XL, Deng XL, Yuan BX, Zhang W, Wang XF, Yang YB* (2010) Experimental diabetes mellitus down-regulates large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in cerebral artery smooth muscle and alters functional conductance. *Curr Neurovasc Res* 7(2): 75–84.
<https://doi.org/10.2174/156720210791184925>
46. *Pabbidi MR, Roman RJ* (2017) Elevated K^+ channel activity opposes vasoconstrictor response to serotonin in cerebral arteries of the fawn hooded hypertensive rat. *Physiol Genom* 49: 27–36.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00072.2016>
47. *Mistry DK, Garland CJ* (1998) Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels (BK_{Ca}) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 124(6): 1131–1140.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701940>
48. *Kimmoun A, Ducrocq N, Levy B* (2013) Mechanisms of vascular hyporesponsiveness in septic shock. *Curr Vasc Pharmacol* 11(2): 139–149.
49. *Kim HJ, Li M, Nichols CG, Davis MJ* (2021) Large-conductance calcium-activated K^+ channels, rather than K_{ATP} channels, mediate the inhibitory effects of nitric oxide on mouse lymphatic pumping. *Br J Pharmacol* 178(20): 4119–4136.
<https://doi.org/10.1111/bph.15602>
50. *Telinus N, Kim S, Pilegaard H, Pahle E, Nielsen J, Hjortdal V, Aalkjaer C, Boedtkjer DB* (2014) The contribution of K^+ channels to human thoracic duct contractility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307(1): H33–H43.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00921.201>
51. *Heginbotham L, MacKinnon R* (1992) The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* 8: 483–491.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90276-j](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90276-j)
52. *Ruiz Rubio JL, Hernández M, Rivera de los Arcos L, Benedito S, Recio P, García P, García-Sacristán A, Prieto D* (2004) At a concentration selective for calcium-activated $K(KCa)$ channels (3 mM), tetraethylammonium inhibited rolipram responses but not those of PGE1. Role of ATP-sensitive K^+ channels in relaxation of penile resistance arteries. *Urology* 63(4): 800–805.
<https://doi.org/10.1016/j.urology.2003.10.071>
53. *Armstead WM, Hecker JG* (2005) Heat shock protein modulation of K_{ATP} and K_{Ca} channel cerebrovasodilation after brain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(3): H1184–H1190.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00276.2005>
54. *Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA* (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. *Nature* 368: 850–853.
<https://doi.org/10.1038/368850a0>

The Role of Potassium Channels in the Regulation of the Transport Function of Rats Lymph Nodes during Inflammation

G. I. Lobov*

Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia

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

Lymph formed in tissues necessarily passes through lymph nodes (LN), which not only perform an immune function, but also take part in lymph flow through rhythmic high-amplitude contractions. During inflammation, inducible NO synthase (iNOS) is expressed in the lymph nodes, which promotes relaxation of the LN capsule. This study examined the role of K_{ATP} - and BK_{Ca} -channels in sepsis-induced LN remodeling. Sepsis was induced in rats by cecal ligation-puncture surgery. After 12 and 24 h, mesenteric LN were removed and examined in a myograph. K_{ATP} -channels were activated by pinacidil and blocked by glibenclamide. BK_{Ca} -channels blocked TEA and activated NS 1619. The strength of tonic contraction of the LN under the action of activators and blockers was assessed. LN of septic rats named low level of tone during standard stretching. Pinacidil led to greater relaxation of LN in septic rats compared to the control group; the effect of glibenclamide was accompanied by an increase in tone. Pinacidil combined with glibenclamide did not lead to significant changes in LN tone. The use of NS 1619 was accompanied by relaxation of the LN; in the LN of septic rats, the effect was more pronounced. TEA (3 mM) led to an increase in LN tone; the LN of septic rats responded to the use of TEA with a greater contraction. We concluded that NO produced by expressed iNOS in animals with sepsis directly or indirectly activates K_{ATP} - and BK_{Ca} -channels of smooth muscle cells of the capsule in the LN, which leading to hyperpolarization of the smooth muscle cell membrane and their relaxation, which that promotes relaxation of the LN capsule and their hypertrophy of LN. In the future, K_{ATP} - and BK_{Ca} -channels of smooth muscle cells of the lymph node LN capsule may be a potential target for therapeutic intervention to correct the immune response by slowing down or accelerating the flow of lymph through the LN.

Keywords: lymph node, smooth muscle cell, sepsis, inducible NO synthase, nitric oxide, K_{ATP} - and BK_{Ca} -channel

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ АНТИГИСТАМИННЫХ ПРЕПАРАТОВ
НА ПОВЕДЕНЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ *Danio rerio***

© 2023 г. А. В. Жданов^{1, 3, *}, М. В. Комелькова¹, М. А. Горбунова³, С. Л. Хацко^{2, 3},
А. П. Сарапульцев¹, А. В. Калужев^{3, 4, 5, 6, 7}

¹Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия

²Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

³Уральский федеральный университет им. первого президента России Б.Н. Ельцина,
Екатеринбург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

⁶Российский научный центр радиологии и хирургической технологии им. акад. А.М. Гранова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

⁷Научно-технологический университет Сириус, Сочи, Россия

*E-mail: sanya.zhdanov.1996@mail.ru

Поступила в редакцию 02.08.2023 г.

После доработки 17.10.2023 г.

Принята к публикации 19.10.2023 г.

Гистаминовые рецепторы играют важную физиологическую роль в организме — от участия в аллергических реакциях до регуляции памяти и сна, что делает их важной мишенью для создания новых средств терапии. Поскольку антигистаминные препараты первого поколения обладают мощными антихолинергическими и антисеротониновыми побочными эффектами, в клинике им на смену пришли более узконаправленные препараты второго поколения, лишенные многих побочных эффектов. Несмотря на успешное применение на грызунах и людях, тестирование этих препаратов на более широком круге модельных организмов может улучшить понимание их физиологической активности и скорректировать разработку новых препаратов, действующих на этот тип рецепторов. Одним из удобных объектов исследования являются рыбы зебраданио (*zebrafish*, *Danio rerio*) благодаря своей доступности и высокому физиологическому и генетическому сходству с человеком. В работе оценивали влияние хлоропирамина (антигистаминного препарата первого поколения) и препаратов второго поколения (лоратадина и цетиризина) в концентрациях 1, 5 и 10 мг/л на поведение зебраданио в тесте нового аквариума. В целом хлоропирамин и лоратадин оказали седативное влияние, характерное для антигистаминных препаратов, в то время как цетеризин снижал только двигательную активность, но не нарушал другие паттерны поведения рыб. Таким образом, цетиризин показал наименьшее побочное влияние на ЦНС, что делает его наиболее оптимальным и безопасным выбором среди рассматриваемых антигистаминных препаратов.

Ключевые слова: нейротропное действие, антигистаминные препараты, зебраданио, скрининг

DOI: 10.31857/S0869813923120154, **EDN:** CEVVEE

ВВЕДЕНИЕ

Гистамин и гистаминовые рецепторы опосредуют различные важные функции в организме, включая участие в аллергических реакциях, контроль за эмоциями и регуляцию памяти и сна [1–6]. Поэтому различные гистаминовые рецепторы давно являются мишенью для лекарств и играют важную роль в здоровье человека, например, в иммунной регуляции и контроле анафилактического воспаления [7–9]. В различных тканях известно как минимум четыре рецептора к гистамину, однако большинство проявлений гиперчувствительности немедленного типа и аллергических реакций происходит при участии рецептора H1 [10, 11]. С момента успешной разработки первого препарата в 1937 г. антигистаминные средства претерпели усовершенствования в виде препаратов первого и второго поколения [12].

Первые классические антагонисты H1-рецепторов представляют собой антигистаминные препараты первого поколения [13]. Они легко проникают через гематоэнцефалический барьер и связываются с гистаминовыми рецепторами в центральной нервной системе (ЦНС), вызывая галлюцинации, сонливость, беспокойство, бессонницу и другие побочные реакции [14]. H1-антигистаминные препараты второго поколения, по сравнению с первым поколением, редко проникают через гематоэнцефалический барьер и избирательно связываются с периферическими H1-рецепторами, вызывая слабые (либо не вызывая) побочные эффекты на ЦНС [15]. Тем не менее данные препараты могут стимулировать повышенный аппетит и приводить к увеличению веса, а также имеют некоторую степень кардиотоксичности [16]. В целом антигистаминные препараты обычно используются при состояниях, не угрожающих жизни, что создало необходимость тщательной проверки безопасности и постоянному совершенствованию данной категории препаратов. Тестирование антигистаминных препаратов в трансляционных исследованиях с использованием экспериментальных животных [17, 18] позволяет подтвердить эффективность уже существующих препаратов и улучшить разработку новых средств, действующих на H1-рецепторы. Одним из удобных модельных организмов для таких исследований могут стать рыбы зебранию (*zebrafish*, *Danio rerio*), широко используемые в нейробиологических и физиологических исследованиях.

Благодаря легко дифференцируемым поведенческим паттернам и возможности проведения экспериментов с большим количеством животных, зебранию стали удобной платформой для исследований нейротропных лекарственных средств и препаратов-кандидатов [19]. Система гистаминергических нейронов в мозге зебранию организована так же, как и у большинства других позвоночных животных, и сосредоточена в каудальном отделе гипоталамуса с проекциями почти во все отделы мозга. На сегодняшний момент у зебранию идентифицировано три из четырех рецептора к гистамину (HRH1, HRH2 и HRH3), которые помимо головного мозга также экспрессируются в кишечнике, печени, селезенке, жабрах, сердце и глазах [20]. Цель настоящего исследования — оценить воздействие антигистаминных препаратов хлоропирамина, лоратадина и цетиризина в концентрациях 1, 5 и 10 мг/л на поведение рыб зебранию.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполняли на 82 взрослых (возраст 3–5 мес.) короткоплавниковых рыбах данио дикого типа (соотношение самцов и самок ~50 : 50), которые были получены от коммерческого дистрибьютора (ООО “Комета”, Пермь, Россия) и содержались в помещении для водных животных в Уральском федеральном университете. Перед экспериментом животные адаптировались не менее 14 дней к лабораторным условиям и содержались в одном 40-литровом пластиковом аквариуме

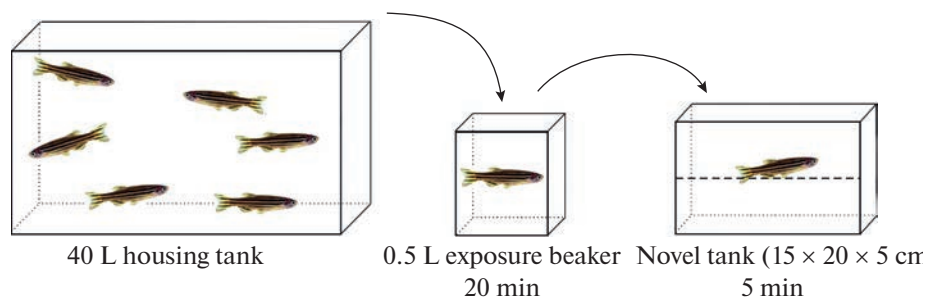


Рис. 1. Схема дизайна эксперимента и модель нового аквариума для тестирования на зебрании.

(высота 45 × 40 длина × 30 ширина, см). Аквариум был заполнен отфильтрованной системной водой с температурой 25°C, pH 6.8–7.2, уровнем аммиака <0.9 мг/л и уровнем нитратов <200 мг/л. Освещение (1000–1100 люкс) обеспечивалось потолочными люминесцентными лампами с 14/10-часовым циклом свет–темнота (включение 8:00) в соответствии с принятыми стандартами содержания и тестирования рыб данио [21]. Все животные, использованные в этом эксперименте, были экспериментально наивными и получали еду (Tetra GMBH, Оснабрюк, Германия) два раза в день.

Исследуемые антигистаминные препараты хлоропирамин (“Супрастин”, ЗАО “Фармацевтический завод ЭГИС”, Будапешт, Венгрия), лоратадин (“Лоратадин-Вертекс”, АО “ВЕРТЕКС”, Санкт-Петербург, Россия) и цетиризин (“Цетрин”, Д-р Редди’с Лабораторис Лтд., Индия), являясь безрецептурными препаратами, были получены из аптеки “Живика” в городе Екатеринбурге. В день эксперимента рыбы случайным образом были разделены на 10 групп: контроль ($n = 8$) и опытные группы с воздействием хлоропирамином, лоратадином и цетиризином в концентрациях 1, 5 и 10 мг/л ($n = 8–10$). Выбор концентраций веществ в эксперименте основан на рекомендациях по применению препаратов и их терапевтической дозе для человека. Каждая навеска исследуемых препаратов диспергировалась в 1 мл ДМСО и затем вводилась в экспозиционный аквариум емкостью 1 л, в который поочередно подсаживались особи зебрании. Рыбы из контрольной группы также подсаживались в экспозиционный аквариум, куда добавлялся 1 мл ДМСО. По истечении 20 мин, которых согласно инструкции достаточно для всасывания и развития антигистаминного эффекта препарата, рыбы далее помещались в тестовые аквариумы и снимались на видеокамеру в течение 5 мин (рис. 1). После каждой съемки в тестовых аквариумах проводилась замены воды. Вода из экспозиционного аквариума с растворенным в ней препаратом также заменялась через каждые 4 рыбы [22].

Тест нового аквариума

Тест нового аквариума является широко известной методикой оценки поведения рыб, активно применяющийся в скрининге различных физиологически активных веществ [23, 24]. Аппарат представляет собой стеклянный аквариум (высота 20 × длина 15 × ширина 5, см), заполненный водой и разделенный горизонтальной маркерной линией снаружи на две равные зоны (рис. 1). Методика аналогична тесту “открытого поля” для грызунов, где животных помещают в новые, ранее незнакомые для них условия. Идея данного теста строится на тенденции зебрании

Таблица 1. Статистические данные по эффектам антигистаминных препаратов на поведение взрослых зебр в тесте новый аквариум (см. рис. 2)

Поведенческий паттерн	Данные статистического критерия	Уровень значимости
Число выходов в верхнюю часть аквариума	F = 6.56	$p < 0.001$
Длительность нахождения в верхней части аквариума	F = 8.81	$p < 0.001$
Время первого выхода в верхнюю часть аквариума	F = 6.17	$p < 0.001$
Число беспорядочных движений	F = 4.04	$p < 0.001$
Частота актов замираний	F = 2.27	$p < 0.03$
Длительность актов замираний	F = 32.00	$p < 0.001$
Пройденное расстояние	F = 14.97	$p < 0.001$
Средняя скорость	F = 14.90	$p < 0.001$
Максимальное ускорение	F = 1.93	$p = 0.06$
Частота актов атаксии	F = 11.17	$p < 0.001$
Длительность актов атаксии	F = 5.91	$p < 0.001$

в первую минуту тестирования тратить 70–85% времени в нижней трети аквариума. Данное поведение чувствительно к широкому спектру препаратов (флуоксетин, диазепам, буспирон, циталопрам, этанол и др.), воздействующие на опиоидные, дофаминовые, серотониновые, холинергические и адренергические рецепторы и процессы ЦНС [25].

Данные видео-трекинга обрабатывались вручную с помощью программного обеспечения RealTimer (ООО “Открытая наука”, Красногорск, Россия), где оценивали частоту, общую продолжительность (с) и латентный период (с) выхода в верхнюю и нижнюю части аквариума, замирание (неподвижность > 2 с), атаксию (потеря положения тела и/или координации движений — лежание на боку, плавание на боку, плавание штопором) и число эрратических (беспорядочных) движений в соответствии с описанием в поведенческом каталоге по зебранию [26]. Видео также анализировалось с помощью программного обеспечения Etho-VisionXT17 (Noldus IT, Вагенинген, Нидерланды), где оценивалась двигательная активность рыб по общему пройденному расстоянию (м), средней скорости движения (м/с) и максимальному ускорению (м/с²).

Все данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего и проанализированы однофакторным дисперсионным анализом с предварительной проверкой выборки на нормальность распределения (критерий Шапиро–Уилка) и парным сравнением апостериорным тестом Даннетта (табл. 1). Во всех анализах значимость была установлена на уровне $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для частоты выхода наверх в тесте нового аквариума отмечен значимый эффект препарата (табл. 1), отмечается его уменьшение в группах с хлоропирамином в концентрации 5 и 10 мг/л и группах с лоратадином во всех концентрациях при сравнении с контролем (рис. 1). В группе с лоратадином также отмечается значимое уменьшение суммарной длительности выхода наверх в концентрации 10 мг/л и

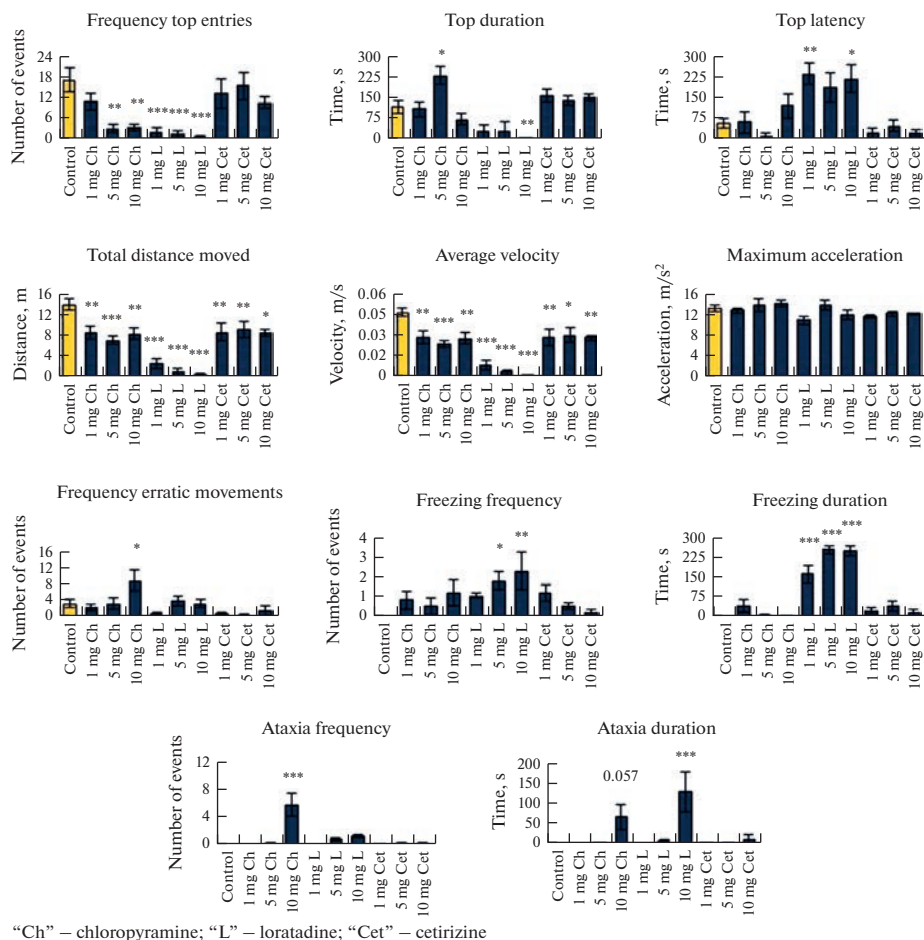


Рис. 2. Поведенческие эффекты антигистаминных препаратов на взрослых зебраданию в тесте новый аквариум (см. Детали статистики в табл. 1).

увеличение времени латентного периода выхода наверх в концентрации 1 и 10 мг/л при сравнении с контролем. Дополнительно в группе хлоропирамина в концентрации 5 мг/л наблюдается значимое увеличение суммарной длительности выхода наверх по сравнению с контролем. Таким образом, препараты хлоропирамин в концентрации 5 и 10 мг/л и лоратадин во всех трех концентрациях уменьшают показатель выхода наверх, а также повышают его латентный период первого выхода наверх, т.е. вызывают седацию и уменьшают их общую активность. При этом седация в группе с лоратадином стойко проявляется с первой концентрации в отличие от группы с хлоропирамином, где эффект проявляется только при высоких дозах препарата (рис. 1).

При рассмотрении двигательной активности рыб отмечается значимое уменьшение показателя пройденного пути и средней скорости во всех опытных группах по сравнению с контролем, что также подтверждает наличие седации (табл. 1). На рис. 1 приведены частоты беспорядочных движений рыб, наблюдается их значимое

увеличение в группе с хлоропирамином в концентрации 10 мг/л по сравнению с контролем, что свидетельствует о нарушениях обычных паттернов поведения у опытных зебраданио.

Анализ распределения замираний (рис. 1) показывает увеличение их частоты в группах с лоратадином в концентрациях 5 и 10 мг/л по сравнению с контролем, а также значимое увеличение суммарной длительности замираний в группе с лоратадином, но уже во всех трех концентрациях по сравнению с контрольной группой. Таким образом, лоратадин во всех трех концентрациях значимо увеличивает показатель замираний, что согласуется с эффектом седации.

Из-за наличия седации у тестируемых препаратов в работе также был произведен подсчет актов атаксии, который показал значимое увеличение частоты и суммарной длительности в группах с хлоропирамином и лоратадином в концентрации 10 мг/л по сравнению с контролем (рис. 1). Наличие атаксии в высоких дозах хлоропирамина и лоратадина может говорить о нарушении координации движений и острой неспецифической токсичности у зебраданио.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования было выявлено, что хлоропирамин в концентрации 10 мг/л оказывает седативный эффект на поведение зебраданио в тесте нового аквариума и значимо снижает показатель выхода наверх, двигательную и исследовательскую активность рыб. В той же концентрации хлоропирамин вызывает нарушение координации движений, что характерно для всех антигистаминных препаратов первого поколения и сопоставляется с результатами на грызунах и клиническими испытаниями на человеке [14, 27, 28]. При этом антигистаминный препарат второго поколения лоратадин также оказал седативный эффект на поведение зебраданио, но помимо уменьшения показателя выхода наверх и двигательной активности, препарат еще увеличивал частоту и длительность замираний. Более того, седативный эффект лоратадина проявляется уже с первой рассматриваемой концентрации в 1 мг/л, а в концентрации 10 мг/л, как и хлоропирамин, вызывает атаксию. Согласно данным литературы, лоратадин не оказывает серьезного влияния на ЦНС, тем не менее допускается появление сонливости и седации у некоторых пациентов и детей уже в терапевтических дозах препарата, что мы и можем наблюдать у рыб зебраданио [15].

Наконец, антигистаминный препарат цетиризин не оказал значимого влияния на поведение рыб кроме снижения двигательной активности, что согласуется с результатами клинических испытаний [15, 29] и делает его наиболее оптимальным и безопасным антигистаминным препаратом в нашем исследовании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на высокую степень безопасности и многочисленные клинические испытания антигистаминных препаратов, их дальнейшее изучение и тестирование на новых модельных организмах может дать новые представления об эффективности и побочных реакциях на ЦНС. Рассматриваемые антигистаминные препараты, за исключением цетеризина, вызвали у зебраданио выраженный нейротропный побочный эффект, что согласуется с клиническими результатами испытаний на человеке и результатами испытаний на других животных моделях (в частности, рекомендуемыми терапевтическими дозировками для взрослых у хлоропирамина является 25 мг, лоратадина и цетиризина 10 мг). Таким образом, зебраданио ввиду своей более высокой фармакологической чувствительности выявили возможное наличие неблагоприятных эффектов у лоратадина уже в низкой, не терапевтиче-

ской дозировке, что ранее не наблюдалось в других экспериментах. Данное исследование подтверждает необходимость введения многосторонних трансляционных доклинических испытаний со множеством видов животных, а также создает предпосылки для изучения более безопасных антигистаминных препаратов как находящихся сегодня на рынке, так и новых препаратов на их основе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комитета по биоэтике Института естественных наук и математики УрФУ, № 2, 3 апреля 2023 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена при поддержке НИУ ЮУрГУ в рамках госзадания (FENU-2023-0014).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brown RE, Stevens DR, Haas HL* (2001) The physiology of brain histamine. *Progress Neurobiol* 63: 637–672.
[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00039-3)
2. *Haas H, Panula P* (2003) The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nature Rev Neurosci* 4: 121–130.
<https://doi.org/10.1038/nrn1034>
3. *Panula P* (2021) Histamine receptors, agonists, and antagonists in health and disease. *Handbook Clin Neurol* 180: 377–387.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820107-7.00023-9>
4. *Schwartz JC* (1991) Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 71: 1–51.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.1.1>
5. *Siegel GJ, Albers RW* (1994) *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. Raven Press.
6. *Thurmond RL, Gelfand EW, Dunford PJ* (2008) The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nature Rev Drug Discov* 7: 41–53.
<https://doi.org/10.1038/nrd2465>
7. *Akdis CA, Blaser K* (2003) Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 112: 15–22.
<https://doi.org/10.1067/mai.2003.1585>
8. *Leurs R* (2011) En route to new blockbuster anti-histamines: surveying the offspring of the expanding histamine receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 32: 250–257.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.02.004>
9. *Tiligada E* (2009) Histamine H3 and H4 receptors as novel drug targets. *Expert Opin Invest Drugs* 18: 1519–1531.
<https://doi.org/10.1517/14728220903188438>

10. *Golightly LK, Greos LS* (2005) Second-generation antihistamines: actions and efficacy in the management of allergic disorders. *Drugs* 65: 341–384.
<https://doi.org/10.2165/00003495-200565030-00004>
11. *Liu C* (2001) Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H4) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol* 59: 420–426.
<https://doi.org/10.1124/mol.59.3.420>
12. *Emanuel M* (1999) Histamine and the antiallergic antihistamines: a history of their discoveries. *Clin Exp Allergy* 29: 1–11.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00004.x-i1>
13. *Simons FER, Simons KJ* (2011) Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *J Allergy Clin Immunol* 128: 1139–1150.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.09.005>
14. *Okamura N* (2000) Functional neuroimaging of cognition impaired by a classical antihistamine, d-chlorpheniramine. *Br J Pharmacol* 129: 115.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702994>
15. *Yanai K* (2017) The clinical pharmacology of non-sedating antihistamines. *Pharmacol Therap* 178: 148–156.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.04.004>
16. *Tagliatela M, Timmerman H, Annunziato L* (2000) Cardiotoxic potential and CNS effects of first-generation antihistamines. *Trends Pharmacol Sci* 21: 52–56.
[https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(99\)01437-6](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(99)01437-6)
17. *Peitsaro N* (2003) Modulation of the histaminergic system and behaviour by α -fluoromethylhistidine in zebrafish. *J Neurochem* 86: 432–441.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01850.x>
18. *Leung LC* (2019) Neural signatures of sleep in zebrafish. *Nature* 571: 198–204.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1336-7>
19. *Rosa JGS, Lima C, Lopes-Ferreira M* (2022) Zebrafish larvae behavior models as a tool for drug screenings and pre-clinical trials: a review. *Int J Mol Sci* 23: 6647.
<https://doi.org/10.3390/ijms23126647>
20. *Peitsaro N* (2007) Identification of zebrafish histamine H1, H2 and H3 receptors and effects of histaminergic ligands on behavior. *Biochem Pharmacol* 73: 1205–1214.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.014>
21. *Sanders GE* (2012) Zebrafish housing, husbandry, health, and care: IACUC considerations. *ILAR J* 53: 205–207.
<https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.205>
22. *Maximino C* (2010) Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behav Brain Res* 214: 157–171.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.031>
23. *Egan RJ* (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 205: 38–44.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
24. *Robinson KS* (2013) Psychopharmacological effects of acute exposure to kynurenic acid (KYNA) in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 108: 54–60.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.04.002>
25. *Cachat JM* (2011) Modeling Stress and Anxiety in Zebrafish. In: Kalueff A, Cachat J *Zebrafish Models in Neurobehavioral Research*. Neuromethods 52 Humana Press. Totowa, NJ.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-922-2_3
26. *Kalueff AV* (2013) Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish* 10: 70–86.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>
27. *Church M* (2010) Risk of first-generation H1-antihistamines: a GA2LEN position paper. *Allergy* 65: 459–466.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02325.x>
28. *Gray SL* (2015) Cumulative use of strong anticholinergics and incident dementia: a prospective cohort study. *JAMA Int Med* 175: 401–407.
<https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2014.7663>
29. *Timmerman H* (2000) Factors involved in the absence of sedative effects by the second-generation antihistamines. *Allergy Suppl* 60: 5–10.
<https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2000.055supp60005.x>

Effects of Antihistamines in Adult Zebrafish in Novel Tank Test

**A. V. Zhdanov^{a, c, *}, M. V. Komelkova^a, M. A. Gorbunova^c, S. L. Khatsko^{b, c},
A. P. Sarapultsev^a, and A. V. Kalueff^{c, d, e, f, g}**

^a*South Ural State University, Chelyabinsk, Russia*

^b*Ural Federal Agrarian Research Center UBRAS, Ekaterinburg, Russia*

^c*Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia*

^d*St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^e*Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia*

^f*Granov Russian Scientific Center for Radiology and Surgical Technology, St. Petersburg, Russia*

^g*Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia*

^{*}*e-mail: sanya.zhdanov.1996@mail.ru*

Histamine receptors play pivotal roles in various physiological functions, ranging from allergic responses to memory and sleep regulation, making them important drug targets. While second-generation antihistamines have been successfully used in rodents and humans, investigating their effects in non-traditional animal models enhances our understanding and aids the development of novel drug candidates. In this study, we examined the impact of the first-generation drug chloropyramine and the second-generation drugs loratadine and cetirizine, at concentrations of 1, 5, and 10 mg/L, on adult zebrafish behavior using the novel tank test. All three drugs significantly altered fish locomotor activity, decreasing distance traveled and average velocity while increasing low acceleration frequency. Chloropyramine at 5 and 10 mg/L and loratadine at 1, 5, and 10 mg/L significantly reduced top entries compared to the control. Additionally, 5 mg/L chloropyramine increased the total duration of top entries, whereas loratadine at 10 mg/L reduced this behavior compared to controls. Overall, chloropyramine and loratadine exhibited a sedative effect typical of antihistamines, while cetirizine solely reduced locomotor activity without affecting other patterns of fish behavior. Thus, cetirizine demonstrated the least impact on the central nervous system among the studied drugs, making it the optimal and safest choice among antihistamines.

Keywords: neurotropic action, antihistamines, danio, screening

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АПОПТОЗА И АУТОФАГИИ В КЛЕТКАХ HeLa
И HEK 293 В УСЛОВИЯХ НЕДОСТАТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

© 2023 г. А. Д. Трубникова¹, Е. С. Прокопенко¹, Т. В. Соколова¹,
О. В. Надей¹, Н. И. Агалакова^{1,*}

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

*E-mail: nagalak@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2023 г.

После доработки 25.10.2023 г.

Принята к публикации 26.10.2023 г.

Целью исследования было сравнение степени развития аутофагии в клетках карциномы шейки матки человека HeLa-V и HeLa-R и в неопухолевых клетках эмбриональных почек человека HEK 293 в условиях голодания двух типов — 24- и 48-часового культивирования в среде DMEM без сыворотки и 4-часовой инкубации в минимальной среде Эрла. В работе оценивали жизнеспособность клеток методом МТТ и экспрессию генов апоптоза (*BCL2*, *BAX*, *CASP3*) и аутофагии (*ULK1*, *BECN1*, *ATG5*, *ATG14*, *MAP1LC3B*) методом ПЦР в реальном времени. Культивирование в условиях сывороточного голодания и в среде Эрла привело к значительному снижению жизнеспособности клеток HEK 293, но не оказало влияния на клетки HeLa-V и HeLa-R. В опухолевых клетках обеих линий увеличивалась экспрессия гена антиапоптотического белка *BCL2*, в то время как в клетках HEK 293 снижалось соотношение генов *BCL2/BAX* и активировался ген *CASP3*. В клетках HeLa-V и HeLa-R в условиях недостатка питательных веществ наблюдались различные комбинации стимуляции генов начальных этапов аутофагии *ULK1*, *BECN1*, *ATG5* и *ATG14*, но ни один из вариантов обработки не влиял на экспрессию гена *MAP1LC3B*. В клетках HEK 293 сывороточное голодание привело к увеличению уровня экспрессии генов *BECN1*, *ATG5*, *ATG14* и *MAP1LC3B*. Таким образом, стимуляция аутофагии в клетках HeLa, особенно HeLa-R, препятствует развитию процессов апоптоза, в то время как в клетках HEK 293 процессы апоптоза и аутофагии происходят параллельно. Культивирование в среде DMEM без сыворотки в течение 48 ч является наиболее эффективным способом индукции аутофагии в клетках опухолевых линий и соответственно наиболее подходящей моделью для изучения роли аутофагии в развитии их резистентности к апоптотическому пути гибели.

Ключевые слова: HeLa, HEK 293, метаболическое голодание, гены апоптоза, гены аутофагии

DOI: 10.31857/S0869813923120117, **EDN:** CHNZTJ

ВВЕДЕНИЕ

В течение многих лет для лечения онкологических заболеваний используются химиотерапевтические препараты, снижающие образование метастазов и увеличивающие срок жизни пациентов. Однако высокая токсичность таких препаратов и появление фенотипов опухолей, устойчивых к применяемой терапии, стали серьезной клинической проблемой [1]. Поэтому одной из важнейших задач в настоя-

щее время является определение путей взаимодействия между гибелью опухолевых клеток и механизмами их выживания, определяющими эффективность лечения. Кроме того, для снижения доз цитотоксических препаратов необходима разработка новых типов комбинированной терапии из соединений, действующих на различные внутриклеточные мишени раковых клеток.

Одним из механизмов, позволяющим раковым клеткам избегать гибели (апоптоза), может быть аутофагия — процесс, при котором поврежденные или ненужные белки, или даже целые органеллы, доставляют в лизосомы для деградации и элиминации [2, 3]. Адаптируя внутриклеточные процессы к недостатку энергетических ресурсов или стрессу (повреждения ДНК, увеличение продукции свободных радикалов), аутофагия активируется как альтернативный источник метаболитов для пролиферации раковых клеток, поэтому они способны выживать в центральных областях опухолей, которые обычно слабо васкуляризованы и плохо снабжаются питательными веществами и кислородом. Утилизируя поврежденные органеллы и накопившиеся токсичные белки, аутофагия способствует росту опухоли. Часто химиотерапевтические препараты индуцируют накопление аутофагосом в клетках раковых линий, что является причиной развития резистентности к такому воздействию [4–6]. Поэтому изучение механизмов аутофагии и ее ингибирование фармакологическими препаратами или генетическими манипуляциями представляет интерес как метод повышения чувствительности раковых клеток к цитотоксическим воздействиям противоопухолевых препаратов и открывает перспективы для разработки новых средств уничтожения раковых клеток.

Выбор экспериментальных условий культивирования клеток, наиболее близких к условиям *in vivo* и адекватных для изучения эффективности фармакологических препаратов, является ключевым этапом любого исследования. В случае аутофагии это должны быть такие условия, при которых ее стимуляция происходит раньше, чем активация апоптоза [7]. Кроме того, время обработки клеток должно быть таким, чтобы аутофагия сама по себе не стала причиной их гибели, они должны иметь возможность восполнить недостаток питательных веществ и вернуться к нормальной жизнедеятельности, поэтому необходимо индуцировать только начальные этапы этого процесса, не допуская критического уровня накопления аутофагосом. Одним из традиционных способов индуцировать аутофагию является голодание, в частности, культивирование в средах без сывороток, глюкозы, аминокислот и витаминов [8]. В этом случае аутофагия необходима для адаптации к временному недостатку питательных веществ. В предыдущих работах для изучения процессов аутофагии и динамики образования аутофагосом и аутолизосом в клетках HeLa и НЕК 293 использовали инкубацию в средах Хэнкса или Эрла, в том числе в комбинации с ионизирующим излучением [9–11]. Целью данного исследования было сравнить интенсивность процессов аутофагии и апоптоза в клетках карциномы шейки матки HeLa (HeLa-R и HeLa-V) и клетках эмбриональных почек человека НЕК 293 в условиях недостатка питательных веществ двух типов (культивирование в среде DMEM без сыворотки и в минимальной среде Эрла) для выявления экспериментальных условий, наиболее подходящих для последующего поиска способов сенсibilизации к противоопухолевым препаратам. В работе сравнивали жизнеспособность клеток и оценивали изменения экспрессии генов, кодирующих маркеры апоптоза (*BAX*, *BCL2*, *CASP3*) и аутофагии (*ULK1*, *ATG5*, *ATG14*, *BECN1* и *MAP1LC3B*).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные линии HeLa-V и НЕК 293 были получены из коллекции клеточных культур фирмы “Биолот” (Россия). Клетки HeLa-R были любезно предоставлены

А.П. Трашковым (Центр доклинических и клинических исследований, НИЦ “Курчатовский институт” — ПИЯФ). Клетки выращивали в среде DMEM (4.5 г/л глюкозы) (Биолот, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Биолот, Россия) при температуре 37°C и 5% CO₂ до достижения плотности 60–70% монослоя. Пассирование проводили с помощью раствора Трипсина-Версена (1 : 1).

Клетки рассеивали на 24-, 12- или 6-луночные культуральные планшеты (Jet Biofil, Китай) с плотностью ~30 × 10³, 70 × 10³ или 150 × 10³ клеток на лунку соответственно. Через сутки опытные лунки дважды промывали буфером DPBS (Биолот, Россия) и заменяли среду на DMEM без сыворотки или на среду Эрла (Биолот, Россия), представляющей собой раствор неорганических солей. В бессывороточной среде DMEM клетки выращивали в течение 24 и 48 ч, в среде Эрла — в течение 4 ч. После этого оценивали их жизнеспособность с помощью МТТ-теста или лизировали для выделения РНК. Каждый эксперимент проводили не менее 4 раз.

Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ, который основан на способности живых клеток превращать желтый тетразолиевый краситель МТТ (3-(4,5-диметилтетразол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) в фиолетовый кристаллический продукт формазан. Раствор МТТ (5 мг/мл PBS) вносили в каждую лунку планшета в конечной концентрации 0.056% за 2 ч до окончания эксперимента. Для растворения кристаллов формазана в лунки добавляли лизирующий раствор (20% SDS, 50% N,N-диметилформамида на соляной кислоте) и оставляли в инкубаторе на 24 ч. Интенсивность фиолетового окрашивания определяли на планшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия) при длине волны 570 нм. Процент жизнеспособных клеток в каждой опытной лунке рассчитывали, принимая экстинкцию контрольных клеток за 100%.

Для выделения суммарной РНК монослой клеток лизировали с помощью однофазного водного реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) из расчета 1 мл на 10 см² поверхности лунки. Полученную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 4°C и 12000 g. Для экстракции РНК к супернатанту добавляли хлороформ (0.2 мл на 1 мл раствора ExtractRNA), инкубировали в течение 5–6 мин при комнатной температуре и центрифугировали 15 мин при 4°C и 12000 g. К водной фазе, содержащей РНК, добавляли изопропанол (0.5 мл на 1 мл раствора ExtractRNA), инкубировали 10 мин при комнатной температуре, центрифугировали 10 мин при 4°C и 12000 g и удаляли супернатант. Осадок заливали 75%-ным этиловым спиртом и хранили при –20°C. Общее содержание РНК в пробах (поглощение при 260 нм) и чистоту (отношение коэффициентов поглощения 260/280 нм) оценивали с помощью спектрофотометра NanoPhotometer—N50 (IMPLEN, Германия). Коэффициент поглощения при 260/280 нм превышал 1.8 во всех образцах, что указывало на их высокую чистоту.

Для синтеза кДНК РНК (1 мкг) смешивали с 1 мкл смеси случайных декануклеотидных праймеров (Random(dN)10-primer) и инкубировали 2 мин при 75°C, реакцию останавливали на льду. К смеси добавляли 4 мкл Storage Buffer 5x (Евроген, Россия), 2 мкл смеси дезоксинуклеотидов (dNTP), 2 мкл дитиотреитола (DTT), 2 мкл деионизированной воды (dH₂O) и 1 мкл MMLV ревертазы из набора MMLV RT (Евроген, Россия). Реакционную смесь инкубировали в течение 5 мин при 25°C, 60 мин при 42°C и 5 мин при 70°C. Полученную кДНК разбавляли в 10 раз dH₂O и хранили при –20°C.

Все реакции ПЦР проводили в режиме реального времени на термоциклере C1000 Touch, совмещенном с блоком обнаружения CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 17 мкл dH₂O, 5 мкл qPCRMix-HS SYBR Master Mix (Евроген, Россия), по 1 мкл

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности, температура и время отжига праймеров, использованных для ПЦР-анализа

Ген	Номер последовательности гена (NCBI)	Прямой праймер (5'→3') Обратный праймер (3'→5')	Температура (°C) и время отжига (с) праймеров
<i>BAX</i>	NM_001291429.2	Forward: TCCCCCGAGAGGTCTTTT Reverse: CGGCCCCAGTTGAAGTTG	57, 10
<i>BCL2</i>	NM_000633.3	Forward: AGTACCTGAACCGGCACCT Reverse: GGCCGTACAGTTCCACAAA	57, 50
<i>CASP3</i>	NM_032991.2	Forward: AACTGGACTGTGGCATTGAG Reverse: ACAAGCGACTGGATGAACC	56, 30
<i>ULK1</i>	NM_003565.4	Forward: GGCAAGTTCGAGTTCTCCCG Reverse: CGACCTCCAAATCGTGCTTCT	59, 50
<i>ATG5</i>	NM_004849.4	Forward: GTATCATCCACAGCCAAC Reverse: GCAAAGTAAGACCAGCCC	53, 50
<i>ATG14</i>	NM_014924.5	Forward: GCGCCAAATGCGTTCAGAG Reverse: AGTCGGCTTAACCTTTCCTTCT	57, 30
<i>BECN1</i>	NM_001313998.2	Forward: CCATGCAGGTGAGCTTCGT Reverse: GAATCTGCGAGAGACCCATC	57, 50
<i>MAP1LC3B</i>	NM_022818.5	Forward: TTCAGGTTCAAAAACCCGC Reverse: TCTCACACAGCCCGTTACC	57, 30
<i>ERN1</i>	NM_001433.5	Forward: CAGCAGACTTTGTCATCGGC Reverse: CTCTCGGGTTTGGTGTCGT	59, 30
<i>EIF2AK3</i>	NM_004836.7	Forward: TGTCGCCAATGGGATAGTGACGAA Reverse: AATCCGGCTCTCGTTTCCATGTCT	59, 20
<i>CNOT4*</i>	NM_001393371.1	Forward: GTCCAAACCTGACTGCATGTATC Reverse: GGTGTTTACCCGCCTGCAT	57, 10

* — контрольный ген.

прямого и обратного праймеров (10 нМ) и 1 мкл раствора исследуемого образца кДНК. Программа амплификации включала начальную денатурацию при 95°C в течение 5 мин и 45 циклов амплификации, каждый из которых состоял из этапа денатурации при 95°C в течение 5 с, этапа отжига при 57–63°C в течение 10–50 с и этапа элонгации при 72°C в течение 30 с. Интенсивность флуоресценции регистрировали в конце каждого этапа элонгации. Результаты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения CFX Manager. Специфичность амплификации определяли по количеству пиков кривых плавления. Для этого ампликоны подвергали термической денатурации, включающей инкубацию при 65°C в течение 5 с и медленное нагревание до 95°C, после чего измеряли флуоресценцию. Все реакции проводили в трех повторах. Все гены также были проанализированы без ДНК-матрицы.

Последовательности использованных праймеров (синтезированных компанией “Евроген”, Россия) представлены в табл. 1. Температура и продолжительность отжига праймеров варьировались в зависимости от оптимальных условий для каждой пары праймеров. Для анализа были отобраны пары праймеров, имеющие эффективность амплификации, близкую к идеальному значению 2, и коэффициент корреляции 0.98 или выше. Эффективность амплификации тестируемых праймеров определяли путем трехкратных последовательных разведений кДНК (с коэффициентом разведения 10), для каждого разведения выполняли три повтора. Температура плавления была оптимизирована с помощью программы Primer Blast tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Содержание GC составляло 40–60%, размер продукта был ограничен 70–250 парами оснований. Значения St для каждого гена были менее 45. Значения St, полученные для каждого набора праймеров, использовали для построения стандартных кривых в зависимости от концен-

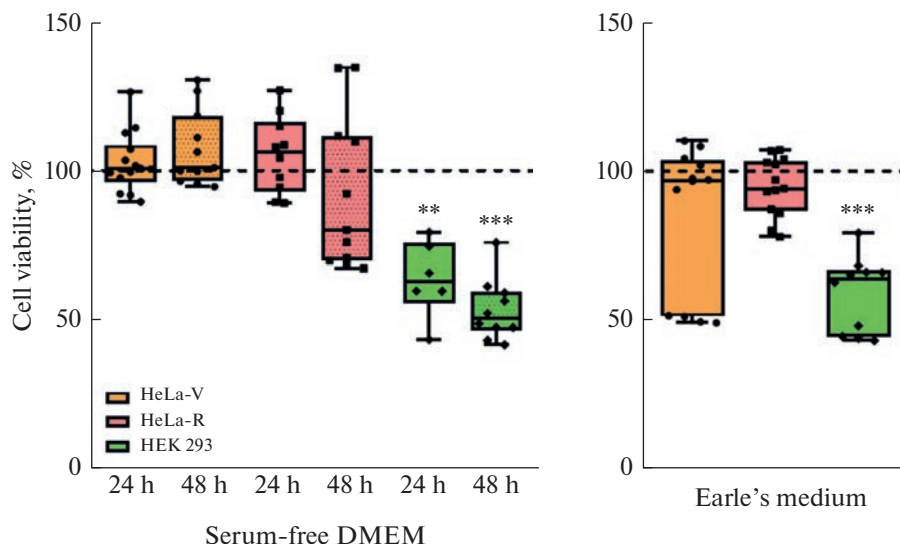


Рис. 1. Жизнеспособность клеток HeLa-V, HeLa-R и HEK 293 после культивирования в среде DMEM без сыворотки (SF) в течение 24 и 48 ч и в среде Эрла в течение 4 ч. Представлены медианы и межквартильные диапазоны ($n = 9-14$) для каждой линии клеток. Уровень жизнеспособности клеток, растущих в полной среде (контроль), принят за 100% и показан в виде прерывистой линии. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

траций кДНК. Эффективность амплификации рассчитывали по формуле $E = 10^{(1/-\alpha)}$, где α — угол наклона стандартной кривой.

Относительную экспрессию целевых генов оценивали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ [12]. Выбор референсных генов не проводили, для нормализации результатов ПЦР использовали ген *CNOT4*, который, согласно литературным данным, стабильно экспрессируется как в нормальных, так и в раковых клетках [13]. Результаты выражали в относительных единицах, где уровень экспрессии в контрольном образце принимался за единицу.

Результаты работы анализировали в программе GraphPad Prism 6 (San Diego, Калифорния, США) с применением теста Манна–Уитни с предварительной проверкой на выбросы и нормальность распределения. Данные представлены в виде графиков boxplot, показаны медиана, верхний и нижний квартили, максимальное и минимальное значения, а также индивидуальные значения. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты теста МТТ показали, что выживаемость клеток обеих опухолевых линий HeLa-V и HeLa-R в условиях длительного голодания (24- и 48-часового культивирования в среде без сыворотки) не отличалась достоверно от таковой в полной ростовой среде (рис. 1). Жизнеспособность клеток неопухолевой линии HEK 293 снижалась до 62 и 53% после 24- и 48-часовой инкубации в бессывороточной среде соответственно.

Культивирование клеток HeLa-R в среде Эрла в течение 4 ч также не оказало влияния на их выживаемость. Жизнеспособность клеток HeLa-V в этой среде в

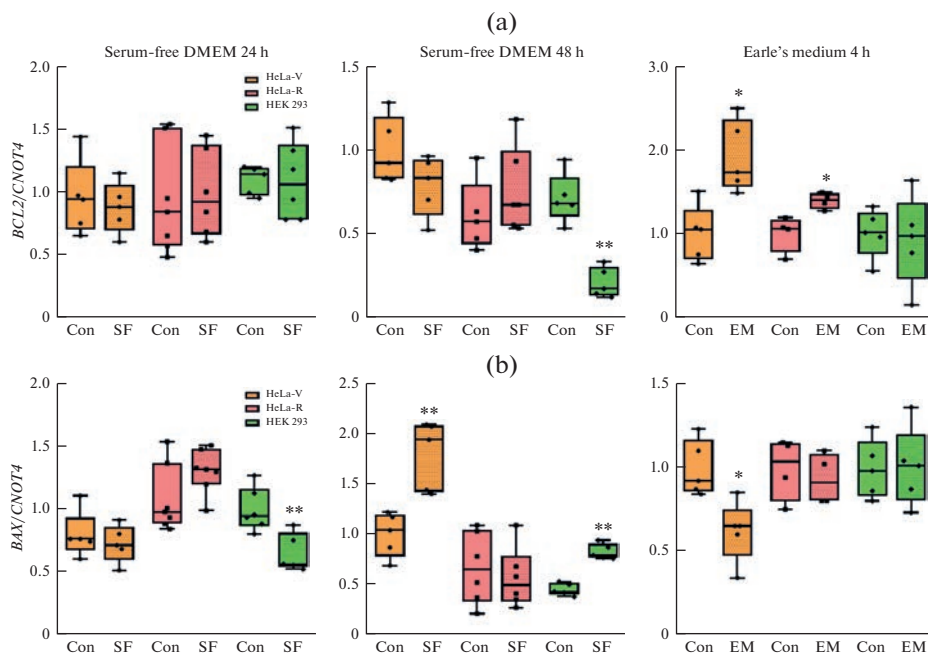


Рис. 2. Изменение относительной экспрессии генов *BCL2* (а) и *BAX* (б) в клетках трех линий после 24- и 48-часовой инкубации в бессывороточной среде DMEM или 4-часовой инкубации в среде Эрла. Данные нормализованы относительно референсного гена (*CNOT4*). Показаны медианы и межквартильные диапазоны ($n = 5-7$). Con – контроль, FS – среда DMEM без сыворотки, EM – среда Эрла. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем для клеток каждой линии.

среднем не отличалась достоверно от контроля, однако в некоторых экспериментах она снизилась примерно наполовину. Жизнеспособность клеток HEK 293 в среде Эрла упала до 58%.

Чтобы сравнить чувствительность опухолевых и неопухолевых клеток к разным вариантам недостатка питательных веществ, в работе оценивали экспрессию генов, кодирующих два важнейших белка митохондриального проапоптотического сигнального каскада – Bcl-2 и Bax, и эффекторную каспазу апоптоза – каспазу 3. В клетках линий HeLa-V и HeLa-R уровень экспрессии гена *BCL2*, кодирующего антиапоптотический белок Bcl-2, оставался стабильным как после 24-часового, так и 48-часового культивирования в среде без сыворотки (рис. 2а). В противоположность этому, длительное голодание (48 ч) привело к статистически достоверному снижению содержания *BCL2* мРНК в клетках HEK 293. Инкубация в среде Эрла в течение 4 ч не оказала влияния на активность гена *BCL2* в клетках HEK 293, однако привела к значительному увеличению уровня экспрессии этого гена в клетках HeLa-V и HeLa-R.

Экспрессия гена *BAX* в клетках HeLa-V не изменилась после 24-часового, но увеличилась после 48-часового культивирования в среде без сыворотки (рис. 2б). В то же время в клетках HeLa-R уровень *BAX* мРНК не отличался от контроля ни после 24, ни после 48 ч голодания. В клетках HEK 293 экспрессия гена *BAX* снижалась после 24 ч, но увеличивалась после 48 ч культивирования в бессывороточной среде, что хорошо согласуется с изменениями уровня гена *BCL2* и снижает соотношение *BCL2/BAX* в сторону большей активности проапоптотического гена.

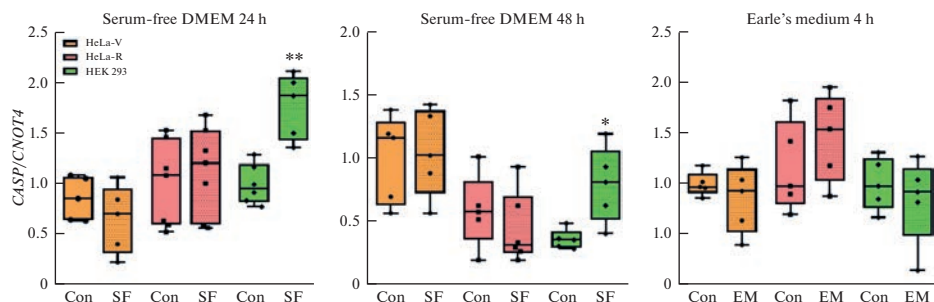


Рис. 3. Относительная экспрессия гена *CASP3* в клетках трех линий в условиях голодания разного типа. Con — контроль, FS — среда DMEM без сыворотки, EM — среда Эрла. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем для клеток каждой линии ($n = 5-7$).

Инкубация в среде Эрла не оказала влияния на активность *BAX* в клетках HeLa-R и HEK 293, но привела к снижению уровня экспрессии этого гена в клетках HeLa-V, что увеличивает соотношение *BCL2/BAX* и указывает на активацию антиапоптотических процессов.

Уровень экспрессии гена *CASP3*, кодирующего эффекторную каспазу-3, в клетках обеих опухолевых линий (HeLa-V и HeLa-R), культивируемых в среде без сыворотки, не отличался от такового в клетках, растущих в контрольных условиях в полной среде (рис. 3). В противоположность этому, содержание мРНК каспазы-3 в клетках HEK 293 значительно увеличивалось как после 24-часового, так и после 48-часового сывороточного голодания, что указывает на активацию апоптотических процессов. Вопреки ожиданиям, в среде Эрла уровень экспрессии гена *CASP3* оставался стабильным в клетках всех клеточных линий.

Для оценки взаимосвязи между культивированием в условиях недостатка питательных веществ и возможной стимуляцией процессов аутофагии в клетках различного происхождения была охарактеризована экспрессия генов, кодирующих некоторые белки ключевых этапов аутофагии.

В клетках HeLa-V уровень мРНК белка Ulk-1, инициирующего процесс аутофагии, принимая сигналы от различных протеинкиназ, вовлеченных в регуляцию клеточного метаболизма, не изменялся ни после 24- или 48-часового культивирования в среде DMEM без сыворотки, ни после 4-часовой обработки в среде Эрла (рис. 4a). В противоположность этому, экспрессия этого гена в клетках HeLa-R значительно увеличивалась в ответ на инкубацию во всех трех средах. В клетках контрольной линии HEK 293 уровень экспрессии гена *ULK1* значительно снижался после 24-часового голодания в бессывороточной среде, но не изменялся после 48-часового культивирования в условиях сывороточного голодания и в среде Эрла.

В отличие от *ULK1* после 24-часового сывороточного голодания активность гена *BECN1*, продукт которого Beclin-1 играет ключевую роль в процессе аутофагии, запуская формирование и созревание фагофоры, ни в одной из клеточных линий достоверно не изменялась. 48-часовое голодание не приводило к изменению экспрессии гена *BECN1* в клетках HeLa-V, но сопровождалось значительным увеличением уровня мРНК в клетках HeLa-R и HEK 293 (рис. 4b). В среде Эрла уровень экспрессии гена *BECN1* не изменялся в клетках HeLa-R и HEK 293, однако снижался в клетках HeLa-V, что, возможно, может быть связано со снижением жизнеспособности этих клеток в некоторых экспериментах (рис. 1).

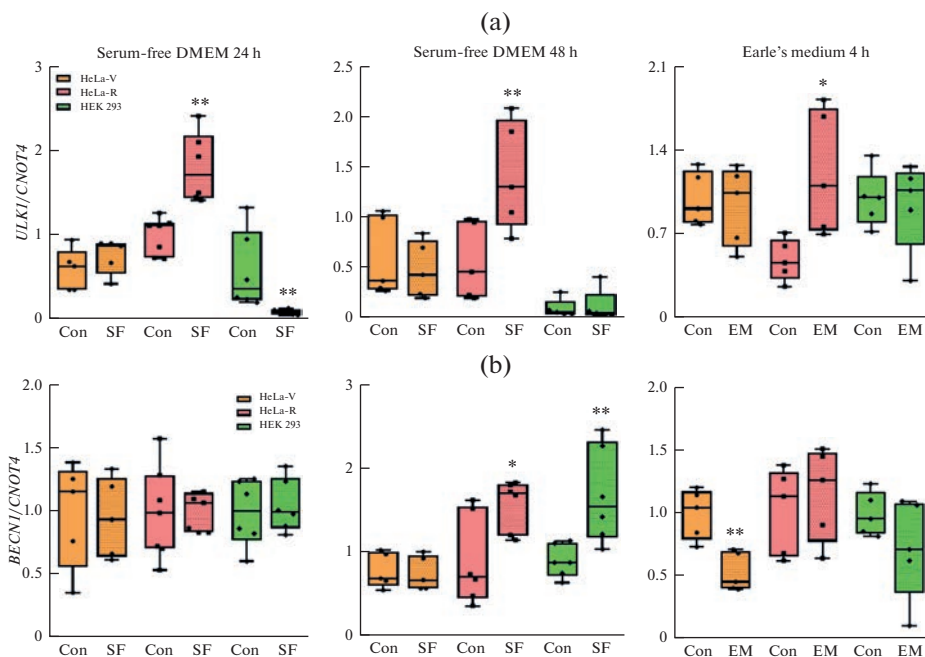


Рис. 4. Экспрессия генов аутофагии *ULK1* (a) и *BECN1* (b) после инкубации в среде DMEM без сыворотки в течение 24 и 48 ч или в течение 4 ч в среде Эрла. Данные нормализованы относительно референсного гена (*CNOT4*). Con – контроль, FS – среда DMEM без сыворотки, EM – среда Эрла. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем для клеток каждой линии ($n = 4-7$).

Экспрессия гена *ATG5*, кодирующего белок Atg5 (autophagy related 5), повышалась в клетках обеих опухолевых линий HeLa-V и HeLa-R, растущих в бессывороточной среде в течение 24 и 48 ч, и в клетках HeLa-V в среде Эрла (рис. 5a). В клетках HEK 293 экспрессия гена *ATG5* увеличивалась только после 2-дневного культивирования в бессывороточной среде.

Уровень мРНК гена *ATG14*, кодирующего белок Atg14 (autophagy related 14), достоверно не изменялся в клетках HeLa-V, культивируемых в условиях сывороточного голодания в течение одних и двух суток, но увеличивался в среде Эрла (рис. 5b). В клетках HeLa-R увеличение экспрессии этого гена наблюдалось после как 24- и 48-часового голодания в бессывороточной среде, так и в среде Эрла. Повышение уровня *ATG14* мРНК в клетках HEK 293 наблюдалось только в ответ на двухдневную инкубацию в среде DMEM без сыворотки.

Экспрессия гена *MAP1LC3B* в клетках HeLa-V и HeLa-R оставалась стабильной независимо от продолжительности и типа недостатка питательных веществ, но достоверно увеличивалась в клетках HEK 293 в ответ на 24- и 48-часовую инкубацию в среде DMEM без сыворотки (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе была проанализирована эффективность индукции аутофагии в клетках карциномы шейки матки человека двух сублиний (HeLa-V и HeLa-R) и неопухолевой клеточной линии эмбриональных почек человека HEK 293, культивируемых в условиях недостатка питательных веществ двух типов (в среде DMEM без сыворот-

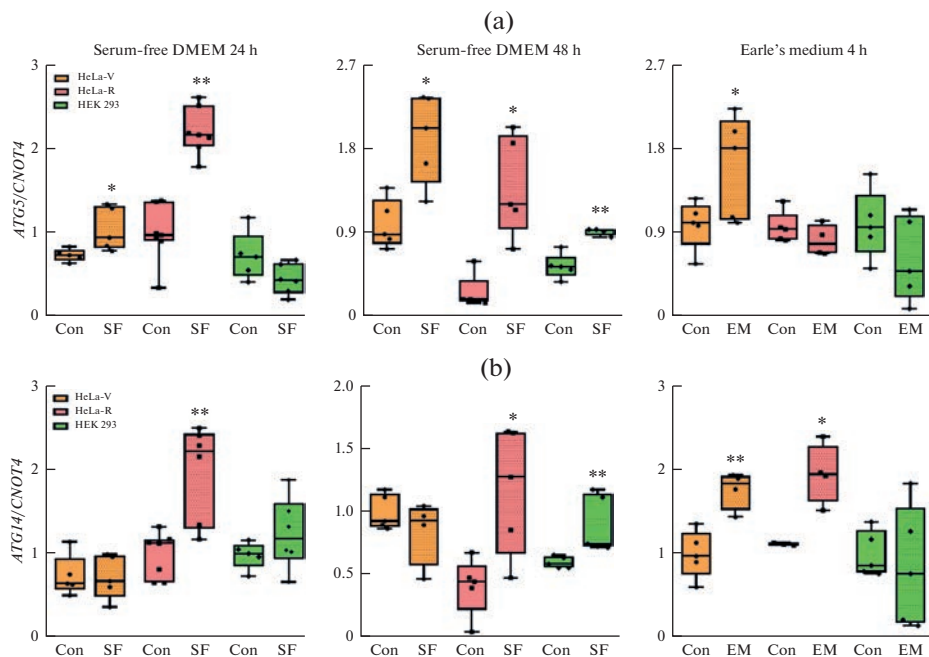


Рис. 5. Изменения экспрессии генов аутофагии *ATG5* (a) и *ATG14* (b) в условиях голодания в культуральных средах разного состава. Данные нормализованы относительно референсного гена (*CNOT4*). Con — контроль, FS — среда DMEM без сыворотки, EM — среда Эрла. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем для клеток каждой линии ($n = 4-6$).

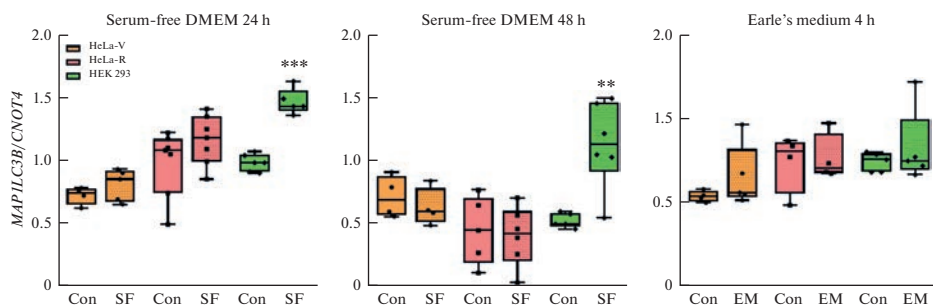


Рис. 6. Экспрессия гена аутофагии *MAP1LC3B* в клетках трех линий после инкубации в различных средах. Данные нормализованы относительно референсного гена (*CNOT4*). Con — контроль, FS — среда DMEM без сыворотки, EM — среда Эрла. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем для клеток каждой линии ($n = 4-6$).

ки и в среде Эрла) с целью дальнейшего поиска способов сенсibilизации раковых клеток к противоопухолевым препаратам.

Сравнительный анализ жизнеспособности показал, что клетки опухолевого происхождения HeLa-V и HeLa-R практически не чувствительны к длительному культивированию в среде без сыворотки, а HeLa-R способны выживать в течение

4 ч даже в минимальной среде Эрла (рис. 1), что в целом подтверждает их низкую потребность в питательных веществах. В противоположность этому, выживаемость клеток неопухоловой линии НЕК 293 значительно снижалась при всех вариантах инкубации.

Эти результаты подтвердились после оценки экспрессии генов (*BCL2*, *BAX*, *CASP3*), кодирующих три ключевых посредника клеточной гибели (*Bcl-2*, *Bax*, каспазу-3) (рис. 2, 3). Белки суперсемейства *Bcl-2* (*B-cell lymphoma/leukemia-2*) располагаются на внешней мембране митохондрий и являются важнейшими регуляторами митохондриального пути апоптоза, функционирующими как активаторы каспаз [14, 15]. Антиапоптотический белок *Bcl-2* напрямую связывает проапоптотические белки (в том числе *Bax*), таким образом обеспечивая целостность митохондриальной мембраны и предотвращая высвобождение нескольких молекул, например цитохрома *C*, из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль. Если уровень *Bcl-2* в клетке недостаточен для ингибирования активности *Bax*, последний олигомеризуется и образует поры на внешней мембране митохондрий, что увеличивает ее проницаемость и приводит к выходу цитохрома *C*, являясь сигналом к апоптозу. Каспазы, семейство цистеиновых протеаз, играют центральную роль в цепи молекулярных процессов, регулирующих запуск и прогрессирование гибели клеток [16, 17]. В этих каскадах инициаторные каспазы (например, 8 и 9) стимулируются множеством летальных стимулов, генерируемых внутри клеток или на клеточной мембране, в то время как эффекторные каспазы (3 и 7) ответственны за протеолитическое расщепление специфических субстратов и разрушение клеточных компонентов, приводя к морфологическим изменениям, типичным для апоптоза.

Результаты данной работы показали, что длительное культивирование в условиях недостатка питательных веществ не инициирует апоптоз в клетках HeLa-R, они способны увеличивать активность антиапоптотического гена *BCL2* даже в минимальной среде Эрла (рис. 2). В клетках НЕК 293 и HeLa-V повышение экспрессии гена *BAX* на фоне падения уровня *BCL2* мРНК в условиях сывороточного голодания, т.е. снижение соотношения *BCL2/BAX*, косвенно указывает на стимуляцию митохондриального пути апоптоза (рис. 2). В противоположность этому, в среде Эрла соотношение *BCL2/BAX* в клетках HeLa-V увеличивалось, что указывает на сдвиг между активностью кодируемых ими проапоптотического белка *Bax* и антиапоптотического белка *Bcl-2* в сторону антиапоптотических процессов, увеличивая жизнеспособность клеток этой линии. Однако увеличение экспрессии гена *CASP3*, кодирующего ключевой эффекторный белок клеточной гибели каспазу-3, наблюдалось только в клетках неопухолового происхождения НЕК 293 (рис. 3). В целом это подтверждает меньшую чувствительность HeLa-V и высокую резистентность клеток HeLa-R к индукции апоптоза, и может объяснить хорошо известную нечувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам.

Анализ экспрессии нескольких генов, кодирующих белки ключевых этапов аутофагии (*ULK1*, *BECN1*, *ATG5*, *ATG14*, *MAPLC3B*), показал, что метаболическое голодание приводит к активации этого механизма гибели в клетках всех трех линий. Аутофагия не включает активацию каспаз, для нее характерно изменение уровней молекулярных маркеров *Ulk1*, *Beclin-1*, белков семейства *Atg*, процессинг белка *LC3* и накопление аутофагосом [18, 19]. Белок *Ulk1* активируется в условиях недостатка питательных веществ и является критически необходимым для индукции аутофагии и ранних этапов биогенеза аутофагосом [20]. *Ulk1* напрямую фосфорилирует белок *Beclin-1* и активирует некоторые другие киназы. *Beclin-1* играет ключевую роль в процессе аутофагии, запуская формирование и созревание фагофоры. В комплексе с *Bcl-2* *Beclin-1* ингибирует аутофагию, а нарушение этого взаимодействия вследствие конкурентного образования связи *Bcl-2/Bax* ведет к ее активации. Свободный *Beclin-2* является ключевым эффектором инициаторного ком-

плекса аутофагии наряду с PI3K киназой и белком p150 [21, 22]. Таким образом, Beclin-1 в комплексе с Bcl-2 функционирует как молекулярный “переключатель” между аутофагией и апоптозом. Белок Atg14 контролирует фосфорилирование Beclin-1 и инициирует его транслокацию из сети Гольджи к аутофагосомам в процессе аутофагии [23, 24]. Белок Atg5 (autophagy related 5) участвует в расширении мембраны фагофоры в аутофагических везикулах. В комплексе с другими членами семейства Atg, например Atg-12, он участвует в процессах инициации и элонгации фагофоры, а на поздних стадиях необходим для образования липидной мембраны аутофагосомы и конъюгации LC3 с фосфатидилэтаноламином мембран [25, 26]. Активный Atg5 предотвращает активацию каспаз и апоптоз, увеличивая интенсивность аутофагии, однако в митохондриях он может действовать и как проапоптотическая молекула. Белок LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) является одним из центральных структурных белков мембран аутофагосом, участвующим в их биогенезе и отборе субстрата аутофагии [27, 28]. На стадии инициации цитоплазматическая форма LC3A (18 kDa) подвергается протеолизу с присоединением фосфатидилэтаноламина, что приводит к появлению активной формы LC3B (16 kDa), необходимой для удлинения мембраны фагофора, терминального слияния аутофагосомы с мембраной-мишенью и взаимодействия аутофагосомы с компонентами цитоскелета.

В нашей работе время и вариант недостатка питательных веществ (24- или 48-часовое культивирование в среде DMEM без сыворотки или 4 ч в среде Эрла), необходимых для стимуляции аутофагии, а также тип клеток и природа экспрессируемых молекул различались. В неопухолевых клетках НЕК 293 однодневное культивирование в бессывороточной среде подавляло активность гена *ULK1* (рис. 4), что может быть связано с активацией апоптотических процессов (рис. 3). Однако после 48-часовой инкубации в этих клетках также увеличивалась активность генов *BECN1* (рис. 4), *ATG5* и *ATG14* (рис. 5), что указывает на параллельную или вторичную индукцию процессов аутофагии. Более того, в клетках НЕК 293 оба варианта сывороточного голодания привели к увеличению экспрессии ключевого гена аутофагии, маркера зрелых аутофагосом *MAP1LC3B* (рис. 6). В опухолевых клетках обеих линий наблюдались различные комбинации стимуляции генов начальных этапов аутофагии *ULK1* и *BECN1* (рис. 4), *ATG5* и *ATG14* (рис. 5), однако ни один из вариантов метаболического голодания не привел к увеличению экспрессии гена *MAP1LC3B*, что могло бы указывать на полноценное завершение процесса аутофагии (рис. 6).

Таким образом, стимуляция аутофагии в клетках HeLa, особенно HeLa-R, препятствует развитию процессов апоптоза, в то время как в клетках НЕК 293 процессы апоптоза и аутофагии происходят параллельно и приводят к их гибели. Этот феномен по крайней мере частично может объяснить высокую резистентность раковых клеток некоторых типов к химиотерапевтическим препаратам. Сравнительный анализ активации генов аутофагии в разных условиях недостатка питательных веществ показал, что наиболее подходящим вариантом для изучения особенностей этого процесса в опухолевых клетках является 48-часовое культивирование в среде DMEM без сыворотки. Именно такой тип голодания индуцировал начальные этапы аутофагии, но не приводил к ее завершению, что указывает на адаптацию клеток к недостатку питательных веществ, и может быть использован для поиска способов сенситизации раковых клеток к цитотоксическим препаратам.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований с участием людей или с использованием животных в качестве экспериментальных объектов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00316 (<https://rscf.ru/project/23-25-00316/>) с использованием оборудования центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента (Н.И.А.), проведение экспериментов и сбор материала для исследования (А.В.Т., Е.Д.П., Т.В.С., О.В.Н.), обработка результатов (А.В.Т., Е.Д.П., О.В.Н., Н.И.А.), написание и редактирование текста (Н.И.А.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chern YJ, Tai IT* (2020) Adaptive response of resistant cancer cells to chemotherapy. *Cancer Biol Med* 17(4): 842–863.
<https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0005>
2. *Noguchi M, Hirata N, Tanaka T, Suizu F, Nakajima H, Chiorini JA* (2020) Autophagy as a modulator of cell death machinery. *Cell Death Dis* 11: 517.
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2724-5>
3. *Thorburn A* (2018) Autophagy and disease. *J Biol Chem* 293(15): 5425–5430.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R117.810739>
4. *Goldsmith J, Levine B, Debnath J* (2014) Autophagy and cancer metabolism. *Methods Enzymol* 542: 25–57.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00002-9>
5. *Zhang T, Yu J, Cheng S, Zhang Y, Zhou CH, Qin J, Luo H* (2023) Research Progress on the Anticancer Molecular Mechanism of Targets Regulating Cell Autophagy. *Pharmacology* 108(3): 224–237.
<https://doi.org/10.1159/000529279>
6. *Rahman MA, Saikat AS, Rahman MS, Islam M, Parvez MA, Kim B* (2023) Recent Update and Drug Target in Molecular and Pharmacological Insights into Autophagy Modulation in Cancer Treatment and Future Progress. *Cells* 12(3): 458.
<https://doi.org/10.3390/cells12030458>
7. *Su M, Mei Y, Sinha S* (2013) Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. *J Oncol* 2013: 102735.
<https://doi.org/10.1155/2013/102735>
8. *King KE, Losier TT, Russell RC* (2021) Regulation of Autophagy Enzymes by Nutrient Signaling. *Trends Biochem Sci* 46(8): 687–700.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.006>
9. *Kong EY, Cheng SH, Yu KN* (2018) Induction of autophagy and interleukin 6 secretion in bystander cells: metabolic cooperation for radiation-induced rescue effect? *J Radiat Res* 59(2): 129–140.
<https://doi.org/10.1093/jrr/rrx101>
10. *Bampton ET, Goemans CG, Niranjana D, Mizushima N, Tolkovsky AM* (2005) The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. *Autophagy* 1(1): 23–36.
<https://doi.org/10.4161/auto.1.1.1495>
11. *Chen Y, Azad MB, Gibson SB* (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ* 16(7): 1040–1052.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2009.49>
12. *Racz GA, Nagy N, Tovari J, Apati A, Vertessy BG* (2021) Identification of new reference genes with stable expression patterns for gene expression studies using human cancer and normal cell lines. *Sci Rep* 11: 19459.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98869-x>
13. *Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X* (2013) An improvement of the 2^{−ΔΔCT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* 3(3): 71–85.
14. *Eichhorn JM, Alford SE, Sakurikar N, Chambers TC* (2014) Molecular analysis of functional redundancy among anti-apoptotic Bcl-2 proteins and its role in cancer cell survival. *Exp Cell Res*.

- 322: 415–424.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.02.010>
15. Singh R, Letai A, Sarosiek K (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20: 175–193.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
 16. Dixit VM (2023) The road to death: Caspases, cleavage, and pores. *Sci Adv* 9(17): eadi2011.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.adi2011>
 17. Sahoo G, Samal D, Khandayataray P, Murthy MK (2023) A Review on Caspases: Key Regulators of Biological Activities and Apoptosis. *Mol Neurobiol* 60(10): 5805–5837.
<https://doi.org/10.1007/s12035-023-03433-5>
 18. Lamark T, Johansen T (2021) Mechanisms of Selective Autophagy. *Annu Rev Cell Dev Biol* 37: 143–169.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-035530>
 19. Majeed ST, Majeed R, Andrabi KI (2022) Expanding the view of the molecular mechanisms of autophagy pathway. *J Cell Physiol* 237(8): 3257–3277.
<https://doi.org/10.1002/jcp.30819>
 20. Rong Z, Zheng K, Chen J, Jin X (2022) Function and regulation of ULK1: From physiology to pathology. *Gene* 840: 146772.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146772>
 21. Vega-Rubín-de-Celis S (2019) The Role of Beclin 1-Dependent Autophagy in Cancer. *Biology* 9(1): 4.
<https://doi.org/10.3390/biology9010004>
 22. Prerna K, Dubey VK (2022) Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding. *Int J Biol Macromol* 204: 258–273.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.005>
 23. Menon MB, Dhamija S (2018) Beclin 1 Phosphorylation – at the Center of Autophagy Regulation. *Front Cell Dev Biol* 6: 137.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00137>
 24. Ohashi Y (2021) Activation Mechanisms of the VPS34 Complexes. *Cells* 10(11): 3124.
<https://doi.org/10.3390/cells10113124>
 25. Zhou P, Zhang Z, Liu M, Li P, Zhu Y (2023) Effects of autophagy-related gene 5 on tumor development and treatment (Review). *Oncol Rep* 50(2): 155.
<https://doi.org/10.3892/or.2023.8592>
 26. Changotra H, Kaur S, Yadav SS, Gupta GL, Parkash J, Duseja A (2022) ATG5: A central autophagy regulator implicated in various human diseases. *Cell Biochem Funct* 40(7): 650–667.
<https://doi.org/10.1002/cbf.3740>
 27. Chen KD, Lin CC, Tsai MC, Huang KT, Chiu KW (2018) Tumor microenvironment mediated by suppression of autophagic flux drives liver malignancy. *Biomed J* 41(3): 163–168.
<https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.002>
 28. Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2503–2518.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>

Expression of Apoptosis and Autophagy Genes in HeLa and HEK 293 Cells under Conditions of Nutrient Deprivation

A. D. Trubnikova^a, E. S. Prokopenko^a, T. V. Sokolova^a,
O. V. Nadei^a, and N. I. Agalakova^a, *

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

*e-mail: nagalak@mail.ru

The goal of the study was a comparing the degree of development of autophagy in the human cervical carcinoma cells of HeLa-V and HeLa-R sublines and non-tumor human embryonic kidney cells HEK 293 under two types of starvation conditions – 24- and 48-h culture in serum-free DMEM medium and 4-h incubation in Earle's minimal medium. The work assessed cell viability using MTT method and the expression of apoptosis (*BCL2*, *BAX*, *CASP3*) and autophagy (*ULK1*, *BECN1*, *ATG5*, *ATG14*, *MAP1LC3B*) genes using real-time PCR. Cultivation under serum starvation and Earl's medium resulted in a significant decrease in the viability of HEK 293 cells, but had no influence on HeLa-V and HeLa-R cells. In the tumor cells of both lines, the expression of

anti-apoptotic gene *BCL2* increased, while in HEK 293 cells the *BCL2/BAX* ratio decreased and *CASP3* gene was activated. In HeLa-V and HeLa-R cells, nutrient deprivation induced the stimulation of various combinations of genes *ULK1*, *BECN1*, *ATG5* and *ATG14* implicated in the initial stages of autophagy, but none of the treatments affected the expression of *MAP1LC3B* gene. In HEK 293 cells, serum starvation led to increase in expression level of *BECN1*, *ATG5*, *ATG14* and *MAP1LC3B* genes. Thus, stimulation of autophagy in HeLa cells, especially HeLa-R, prevents the development of apoptotic processes, while in HEK 293 cells the processes of apoptosis and autophagy occur in parallel. Culture in the serum-free DMEM for 48 h appears to be most effective way to induce autophagy in tumor cell lines and, accordingly, the most suitable model for studying the role of autophagy in the development of their resistance to apoptotic pathway of death.

Keywords: HeLa, HEK 293, nutrient deprivation, apoptosis genes, autophagy genes

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭНДОТЕЛИЙ-НЕЗАВИСИМОЕ АНТИСОКРАТИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ
ПЕРИВАСКУЛЯРНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ АОРТЫ КРЫСЫ
В НОРМЕ И ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ,
ИНДУЦИРОВАННЫХ ДИЕТОЙ КАФЕ**

© 2023 г. М. Н. Панькова*

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

**E-mail: mpankova@bk.ru*

Поступила в редакцию 17.08.2023 г.

После доработки 30.10.2023 г.

Принята к публикации 31.10.2023 г.

Изменения морфо-функциональных свойств сосудистого русла, происходящие при использовании высококалорийного питания, имеют важное клиническое значение, но роль периваскулярной жировой ткани (ПВЖТ) в этих процессах мало изучена. Целью данной работы было исследование прямого влияния ПВЖТ на сократительную деятельность гладких мышц аорты крыс при метаболических нарушениях, возникающих при использовании диеты кафе (ДК). Было показано, что 7 нед. содержания животных на данной диете приводило к избыточному накоплению висцеральной жировой ткани, нарушениям углеводного и липидного обмена, проявляющимся в виде гипергликемии и гипертриглицеридемии, что характеризует развитие метаболического синдрома. С помощью проволочной миографии на деэндоотелизированных кольцевых сегментах грудной части аорты крысы продемонстрирована важная функциональная роль ПВЖТ в регуляции сосудистого тонуса. В контрольной группе животных, находящихся на стандартном питании, наличие ПВЖТ уменьшало вазоконстрикцию, вызванную стимуляцией адренорецепторных структур фенилэфрином. В опытной группе у крыс при развитии метаболического синдрома, вызванного ДК, происходило снижение протективного действия ПВЖТ. Реализация этого влияния осуществлялась с участием потенциалозависимых и/или Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов гладких мышц, в то время как вовлеченность АТФ-чувствительных K^{+} -каналов выражена слабо и не изменялась при метаболических изменениях, обусловленных применением ДК. Частично антисократительное влияние ПВЖТ опосредуется через оксид азота (NO), продуцируемого самой ПВЖТ. При метаболических изменениях, вызванных ДК, эндотелий-независимое антисократительное действие NO полностью устраняется без изменения чувствительности к нему сосудистых гладких мышц.

Ключевые слова: периваскулярная жировая ткань, аорта, сосудистая гладкая мышца, вазодилатация, метаболический синдром, диета кафе, фенилэфрин

DOI: 10.31857/S0869813923120075, **EDN:** C1H1DV

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия было сформировано представление о жировой ткани как о метаболически активном органе, играющем важную роль в регуляции гомеостаза организма, механизмы влияния которого остаются слабо изученными. Связь

ожирения с сердечно-сосудистыми заболеваниями [1] и широкое распространение метаболического синдрома в мировом сообществе актуализируют решение проблемы, связанной с непосредственным влиянием жировой ткани на состояние сосудистого русла как в нормальных физиологических условиях, так и при избыточном ее накоплении. В экспериментальных условиях метаболические изменения, характеризующие развитие метаболического синдрома и проявляющиеся в виде повышенного накопления жировой ткани, гипергликемии и дислипидемии, могут быть получены как в генетических моделях, так и индуцированы применением различных диет [2]. Особый интерес среди диетиндуцированных моделей представляет собой диета “кафе” (ДК), которая, в отличие от высокожировых диет или диет с повышенным содержанием сахаров, включает в себя разнообразные высококалорийные продукты, и, таким образом, более приближена к реальному потреблению пищи в повседневной жизни человека [3].

Возрастающее количество исследований в области участия жировой ткани в поддержании гомеостаза организма показало важность не только биологически активных веществ, продуцируемых жировой тканью и оказывающих эндокринное влияние на работу различных органов, включая сердечно-сосудистую систему, но и необходимость наличия неповрежденной периваскулярной жировой ткани (ПВЖТ) для поддержания сосудов в функциональном состоянии. ПВЖТ окружает подавляющее большинство кровеносных сосудов за исключением сосудов мозга, а тесный контакт ПВЖТ с адвентицией сосудов дает основание ряду исследователей рассматривать ее как четвертый слой сосудистой стенки [4]. Влияние ПВЖТ на сосуды не ограничивается выполнением ранее известной структурной (опорной) функции. За последние годы выявлено большое количество физиологически активных веществ, продуцируемых ею и способных влиять на состояние стенки сосудов, а следовательно, изменения, происходящие в самой ПВЖТ при метаболических нарушениях и приводящие к изменению выработки этих веществ, отражаются в поддержании сосудистого тонуса и регуляции кровотока. Целью данной работы было исследование непосредственного (прямого) влияния ПВЖТ на сократительную деятельность гладких мышц аорты крыс при метаболических нарушениях, возникающих при использовании ДК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные для исследования были получены из Центра коллективного пользования “Биоколлекция” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Исследование было проведено на самцах крыс Wistar в возрасте 4 месяцев (масса тела от 410 до 470 г) к началу диеты. Животные были разделены случайным образом, но с учетом равномерности распределения по массе тела на 2 группы: 1-я — контрольная, находившаяся на стандартной диете в виде сухого корма, *ad libitum*; 2-я — получавшая ДК. Во второй группе животным предоставлялся свободный доступ к стандартному корму и воде, в то же время у них имелся также свободный доступ (т.е. право выбора) к высококалорийной пище и 10%-ному раствору сахарозы. Перечень компонентов ДК представлен в табл. 1. В ежедневный набор ДК входило 4 случайно выбранных из этого списка продукта. Калорийность стандартного корма составляла 250 ккал на 100 г.

Крыс содержали на соответствующем рационе в течение 7 нед. и производили их еженедельное взвешивание с целью оценки влияния диеты на прибавку в массе тела. Еженедельную прибавку в массе тела (привес) рассчитывали как разницу текущей измеренной и исходной массы животного.

В конце диеты проводили оценку уровня глюкозы в крови с использованием анализатора AccuCheck Active (Германия) с тест-полосками для глюкозы и уровня

Таблица 1. Калорийность продуктов, использованных в ДК

Продукт	Калорийность на 100 г, ккал	Продукт	Калорийность на 100 г, ккал
Мини-круассаны	450	Перловая каша с салом	550
Вафли	540	Сдоба	460
Кукурузные палочки	510	Чипсы	470
Рулет бисквитный	350	Печенье	440

триглицеридов (ТГ) с использованием анализатора Multicare-in (Италия) с тест-полосками для ТГ в крови. Образцы крови получали из хвостовой вены крыс после 14-часового голодания; перед процедурой кончики хвостов анестезировали с помощью местных анестетиков лидокаина и прилокаина (крем Actiol pro, “Акрихин ХФК” АО, Россия). Для проведения глюкозотолерантного теста (ГТТ), который выполняли на последней неделе диеты, крысам вводили внутривенно раствор глюкозы из расчета 2 г/кг массы тела, оценивали динамику изменения уровня глюкозы в крови в течение 120 мин и изменение площади под кривой (AUC) “глюкоза–время”. Эвтаназию животных осуществляли посредством декапитации, массу эпидидимальной жировой ткани определяли путем взвешивания обеих жировых подушечек. Иссекали грудную часть аорты и помещали в физиологический солевой раствор (physiological salt solution; PSS) с температурой 5°C следующего состава (в mM): NaCl—120.4; KCl—5.9; CaCl₂—2.5; MgCl₂—1.2; NaH₂PO₄—1.2; NaHCO₃—15.5; глюкоза—11.5, предварительно насыщенного газовой смесью, состоящей из 95% O₂ и 5% CO₂; pH 7.4. В дальнейшем в экспериментах использовали кольцевые сегменты верхней и средней части нижней трети аорты. Длина сегмента составляла 2–2.5 мм. Часть колец оставляли интактными, а другую часть под бинокулярным увеличением тщательно очищали от окружающего сосуд периваскулярного жира. Деэндотелизацию кольцевых сегментов осуществляли механически путем осторожного соскабливания внутреннего слоя и в соответствии с имеющимися рекомендациями [5].

Миографическое исследование проводили путем размещения сосудистого кольца между двумя штоками из нержавеющей стали, один из которых являлся продолжением датчика силы FORT-25 (WPI, США). После усиления (усилитель INA333, Texas Instruments Incorporated) сигнал от датчика был оцифрован с частотой 50 Гц (АЦП, встроенный в микроконтроллер STM32F373, STMicroelectronics, США) и далее обработан с помощью программы регистрации, разработанной в Институте экспериментальной медицины и написанной на языке (C++), обеспечивавшей непрерывную запись информации с датчика на протяжении всего эксперимента [6]. Исследуемый препарат был размещен в проточной термостатируемой экспериментальной камере объемом 10 мл и исследован при скорости протока PSS 4–6 мл/мин и температуре 37.5°C. Аортальные кольца подвергали натяжению до 2 г, оставляли для стабилизации состояния в течение 1 ч, после чего проводили регистрацию сократительной активности. В качестве эталона для оценки сократительной способности гладких мышц сосудов использовали гиперкалиевый раствор (60 mM), приготовленный путем замены ионов Na⁺ в PSS на эквимольное количество ионов K⁺, и дальнейшие сократительные ответы на введение фенилэфрина (PhE, Sigma-Aldrich, США) в диапазоне концентраций от 10⁻⁹ до 10⁻⁵ М выражали в % по отношению к зарегистрированному ответу на KCl. При исследовании участия оксида азота (NO) в реализации влияния ПВЖТ на сократительную деятельность аорты были использованы: ингибитор NO-синтазы метиловый эфир N^ω-нитро-L-аргинина—L-NAME (ICN Biomedicals; 10⁻⁴ M), оказывающий ингибирующее действие,

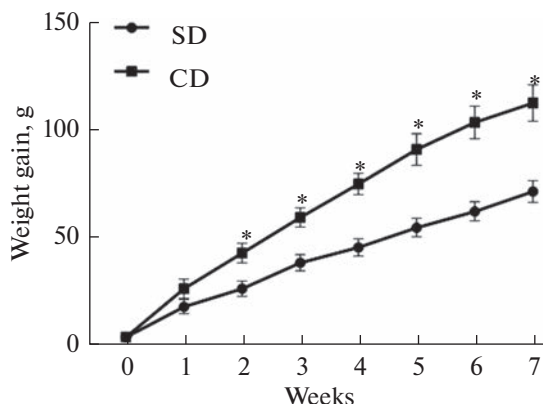


Рис. 1. Ежедневный привес, рассчитанный путем сравнения конечной и исходной массы тела. SD – контрольная группа, получающая стандартный корм ($n = 12$), CD – диета кафетерия ($n = 10$). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM (two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni test). * – различия между группами достоверны ($p < 0.05$).

преимущественно, на eNOS, и экзогенный донор NO-нитропруссид натрия (SNP; ICN Biomedicals; 10^{-6} – 10^{-4} М). В серии экспериментов с участием блокаторов калиевых каналов – тетраэтиламмония хлорида (ТЭА; Sigma-Aldrich, США; 10^{-3} М), глибенкламида (Sigma-Aldrich, США; 10^{-5} М) – проводили регистрацию сократительных ответов на PhE (10^{-6} М) в PSS до и после использования блокатора (в течение 20 мин). Максимальная величина вазоконстрикторного ответа на действие PhE в присутствии блокатора была выражена в % к таковой, измеренной в отсутствие блокатора. Для растворения глибенкламида был использован ДМСО (диметилсульфоксид, Вектон, Россия), концентрация которого в экспериментальной камере не превышала 0.1%.

Статистическая обработка данных была проведена при использовании программы GraphPad Prism 8.0.1. Полученные в экспериментах данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. В соответствии с результатами этой проверки в дальнейшем были использованы соответствующие параметрические или непараметрические статистические критерии – t -критерий Стьюдента, U-критерий Манна–Уитни, одно- и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Бонферрони при последующем post-hoc анализе. Полученные данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего (SEM). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На старте диеты животные контрольной, получавшей стандартный корм, и опытной, находившейся на ДК, групп не имели достоверных различий по массе тела; в дальнейшем крысы, содержащиеся на ДК, продемонстрировали более высокую прибавку в весе, причем это увеличение происходило с первой недели диеты (рис. 1).

Животные группы ДК отдавали предпочтение сладким и жирным продуктам, включенным в рацион, потребление стандартного корма оставалось, но было незначительным. Результаты изменения веса, накопления висцерального жира, показателем которого была выбрана масса эпидидимального жира, а также использо-

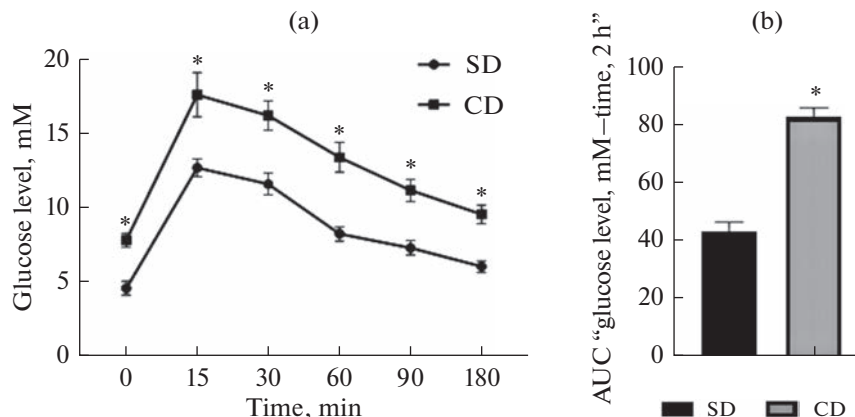


Рис. 2. Результаты глюкозотолерантного теста (ГТТ). SD — группа, получавшая стандартный корм ($n = 7$); CD — группа, содержащаяся на диете кафе в течение 7 нед. ($n = 7$). (a) — график динамики уровня глюкозы в крови в течение 2 ч; (b) — площадь под кривой (AUC) “глюкоза—время”. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM (для анализа динамики уровня глюкозы использованы two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni test, для анализа AUC — t -test). * — различия между группами достоверны ($p < 0.05$).

ванные показатели углеводного (уровень глюкозы в крови) и липидного (уровень ТГ в крови) обмена после 7 недель ДК представлены в табл. 2.

Представленные данные свидетельствуют о развитии у крыс диетной группы нарушений углеводного и липидного обмена, проявляющиеся в виде повышения количества эпидидимального жира, уровней глюкозы и ТГ в крови на 146, 65 и 62% соответственно.

Проведение ГТТ по окончании диеты показало, что толерантность к глюкозе у ДК крыс снижена по сравнению с крысами контрольной группы, это проявлялось в том, что у крыс ДК отмечены более высокие уровни глюкозы максимального подъема и измеренного по окончании 2 ч после введения глюкозы (рис. 2a). Это нашло отражение в увеличении площади под кривой (AUC) “глюкоза—время” (рис. 2b).

При исследовании агонист-индуцированных сокращений, вызванных кумулятивным введением PhE в омывающий раствор, в контрольной группе животных было проведено сравнение величины сократительных ответов кольцевых сегментов при наличии ПВЖТ при сохранности эндотелия и после его удаления. Данные отражены на рис. 3.

Таблица 2. Морфометрические и биохимические показатели после 7 недель содержания крыс на диете кафе

	Контроль	Диета кафе
Исходная масса тела, г	445 $\pm$ 7 ($n = 12$)	443 $\pm$ 6 ($n = 10$)
Масса тела при завершении диеты, г	507 $\pm$ 7 ($n = 12$)	551 $\pm$ 5 ($n = 10$)*
Масса эпидидимального жира, г	6.5 $\pm$ 0.2 ($n = 12$)	16.0 $\pm$ 1.1 ($n = 10$)*
Уровень глюкозы в крови натощак, ммоль/л	4.75 $\pm$ 0.19 ($n = 10$)	7.82 $\pm$ 0.26 ($n = 10$)*
Уровень ТГ в крови натощак, ммоль/л	0.80 $\pm$ 0.06 ($n = 5$)	1.34 $\pm$ 0.14 ($n = 5$)*

Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM (t -test — для параметрических параметров; Mann–Whitney test — для непараметрических параметров). * — различия достоверны между контрольной и опытной группой, $p < 0.05$.

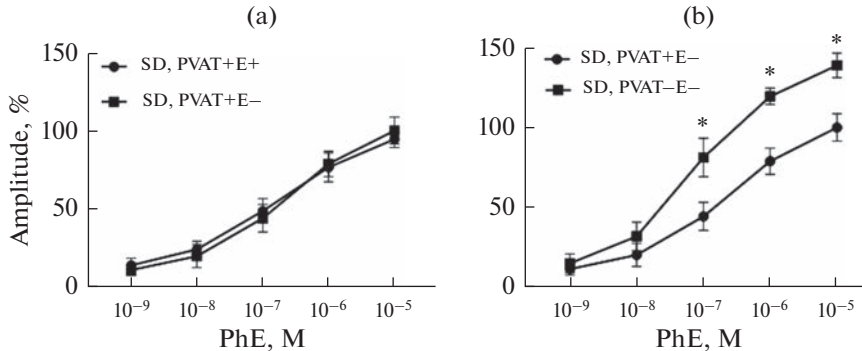


Рис. 3. Сократительные ответы аортальных кольцевых сегментов контрольной группы на действие PhE. (a) — препараты с сохраненной ПВЖТ: E+ — с интактным эндотелием ($n = 6$); E- — с удаленным эндотелием ($n = 7$); (b) — деэндотелизированные препараты в присутствии (PVAT+, $n = 7$) и при удалении (PVAT-, $n = 7$) ПВЖТ. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM (one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni test). * — различия между группами достоверны ($p < 0.05$).

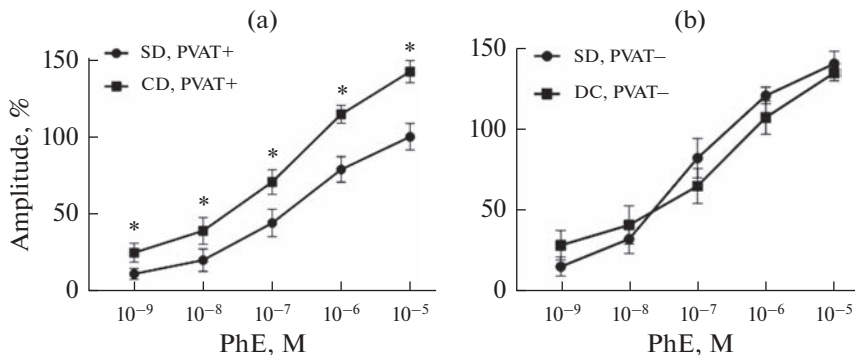


Рис. 4. Сократительные ответы на введение PhE кольцевых деэндотелизированных сегментов аорты крыс при содержании на стандартном корме (SD) и на диете кафе (CD): (a) — при сохраненной ПВЖТ (PVAT+); (b) — после удаления ПВЖТ (PVAT-). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM (one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni test). * — различия между группами достоверны ($p < 0.05$).

На рис. 4 отражены дозозависимые кривые, отражающие величину сократительных ответов сосудов здоровых животных на действие PhE в контрольной и опытной группе после развития инсулинорезистентности, вызванной использованием диеты. В присутствии ПВЖТ кольцевые сегменты аорты демонстрировали меньшую амплитуду сокращений в контрольной группе, в то время как при удалении ПВЖТ достоверных различий между контрольными и опытными группами получено не было.

Учитывая важность снижения влияния NO при дисфункциональных изменениях эндотелия, вызванных высококалорийными диетами, а также возможность продукции NO ПВЖТ и противоречивые сведения относительно его вклада в антисократительные эффекты ПВЖТ, было исследовано изменение сократительной активности аорты в условиях ингибирования NO-синтазы путем предварительного введения в омывающий раствор в течение 20 мин L-NAME (10^{-4} M).

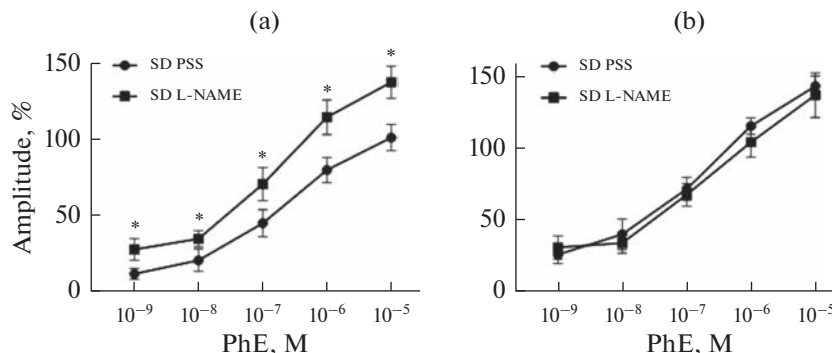


Рис. 5. Величина сократительных ответов на действие PhE аорты (без эндотелия) с сохраненной ПВЖТ до и после инкубации с L-NAME. SD – группа, находящаяся на стандартном корме, CD – группа, находящаяся на диете кафе, PSS – физиологический солевой раствор, L-NAME – в присутствии L-NAME (10^{-4} M). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM (one-way ANOVA, post-hoc Bonferroni test). * – различия между группами достоверны ($p < 0.05$).

На рис. 5 представлены графики изменений величины сокращений сосудов (в %) в присутствии ПВЖТ после предварительной обработки с L-NAME в течение 20 мин. У контрольных животных наблюдалось усиление сократительных ответов на PhE, тогда как у животных после ДК достоверных различий зарегистрировано не было.

В то же время использованная диета не привела к снижению чувствительности гладких мышц сосудов к NO, т.к. вазодилатация, вызванная введением экзогенного донора NO нитропруссидом натрия, существенно не отличалась у контрольных и опытных животных. Величина релаксационных ответов на введение SNP (10^{-5} M) аортальных сегментов с удаленным эндотелием, выраженная в % от амплитуды вазоконстрикции, вызванной гиперкалиевым раствором (60 mM), составила 93.65 ± 1.44 в контрольной группе ($n = 6$) vs 92.10 ± 1.97 в группе ДК ($n = 6$), что не является статистически значимым (t -test, $p < 0.05$).

Для выяснения механизмов реализации антисократительного действия факторов, вырабатываемых ПВЖТ, на сократительную активность гладкомышечных клеток, была проведена серия экспериментов с использованием блокаторов калиевых каналов, которые, как известно, играют ведущую роль в осуществлении релаксационных процессов гладких мышц сосудов. У препаратов с сохраненной ПВЖТ разница величины сокращений на PhE, выраженных в % от величины сокращений в PSS, после предварительной обработки глибенкламидом и ТЭА, представлена на рис. 6.

Применение блокатора АТФ-чувствительных К-каналов (IK_{ATP}) глибенкламида приводило к небольшому усилению сократительных ответов, вызванных PhE, величина которого составила в контрольной ($108.4 \pm 8.1\%$) и в опытной ($109.3 \pm 8.7\%$) группах. Однако следует отметить, что несмотря на незначительное повышение максимальной величины сокращений (менее 10%), в ряде препаратов наблюдали замедление снижения PhE-индуцированного тонического сокращения после инкубации с глибенкламидом. Использование неселективного блокатора потенциалозависимых К-каналов ТЭА приводило к увеличению максимальной величины ответов на 59.6 ± 4.0 у контрольных животных и достоверно не влияло на величину ответа в ДК группе.

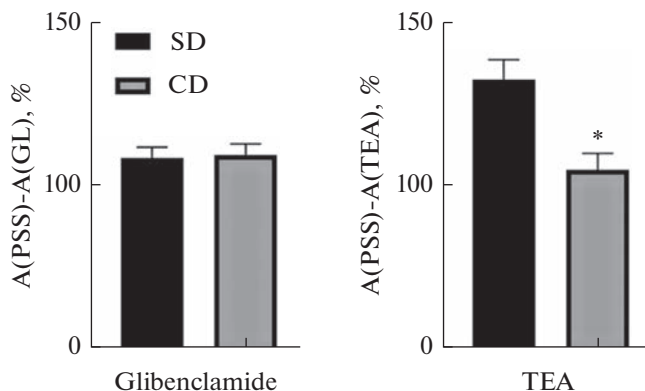


Рис. 6. Изменения сократительных ответов деэндотелизованных сегментов аорты с сохраненной ПВЖТ на действие PhE (10^{-6} M) при применении блокаторов калиевых каналов: (а) глибенкламида (Gl) (10^{-5} M); (б) тетраэтиламмония хлорида (TEA) (10^{-3} M). Величина сокращений выражена в процентах от величины сокращений в PSS. A(PSS) – A (Gl/TEA) разница величины сокращений на PhE, измеренных до A(PSS) и после A(Gl/TEA) предварительной обработки соответствующим блокатором. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM (*t*-test). * – различия между группами достоверны ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование в данном исследовании ДК, ранее зарекомендовавшей себя как адекватная модель для развития метаболического синдрома и сахарного диабета 2-го типа [3], позволило получить более быстрый прирост массы тела и увеличение массы жировой ткани у опытных животных по сравнению с контрольными. Обращает на себя внимание, что достоверное увеличение массы тела наблюдалось уже после 1-й недели диеты и оставалось увеличенным на всем протяжении диеты, тогда как при использовании высококалорийных монодиет подобные изменения происходят либо в более поздние сроки, либо отмечается стабилизация массы тела вслед за повышенным приростом вследствие ограничения потребления пищи [7, 8]. Увеличение массы тела и жировой ткани при использовании ДК может быть объяснено как произвольной гиперфагией, так и повышением калорийности рациона вследствие того, что животные отдавали предпочтение высококалорийным продуктам. Ряд исследователей полагает, что обогащенная окружающая среда, имеющая место при данной диете, препятствует развитию хронического стресса [9], сопровождающегося снижением массы тела, при использовании монодиет.

Многочисленные данные, полученные при изучении взаимосвязи ожирения и функциональным состоянием сердечно-сосудистой системы, свидетельствуют о том, что объективным предиктором развития сердечно-сосудистых заболеваний и риска смертности является абдоминальное (висцеральное) ожирение [10]. Висцеральная жировая ткань расположена в различных депо, и увеличение массы любого из этих депо отражает общее увеличение висцеральной жировой ткани. Ранее было показано, что надежным критерием ее оценки является масса эпидидимальной жировой ткани [11], которая и была использована в данном исследовании. По итогам диеты было зарегистрировано ее увеличение более чем в 2 раза по сравнению с контролем, что продемонстрировало избыточное накопление висцеральной жировой ткани. Гипергликемия и инсулинорезистентность, выявленные по результатам измерения уровня глюкозы в крови натощак и при проведении глюкозо-

толерантного теста, а также повышенное содержание триглицеридов в крови свидетельствуют о нарушении как углеводного, так и липидного обмена у животных после содержания на ДК. Ранее было установлено, что подобные метаболические нарушения приводят к повышению артериального давления вследствие усиления вазоконстрикции и снижения вазодилатации, которые связывали, прежде всего, с вызываемым этими нарушениями снижением продукции эндотелием релаксирующих факторов [12, 13].

Однако интенсивные исследования влияния жировой ткани на состояние сосудистой стенки, проводимые в последние два десятилетия, позволили выявить, что целый ряд веществ, выделяемых ею, способны оказывать как вазорелаксантное, так и вазоконстрикторное действие, включая эффекты адипокинов, опосредуемые через другие структуры, главным образом, гипоталамус [14, 15]. Тесный контакт ПВЖТ с сосудистой стенкой и способность продуцировать вазоактивные вещества [16] обуславливают возможность паракринных влияний. В настоящем исследовании было продемонстрировано, что сократительные ответы сосудов на применение PhE во всем использованном диапазоне концентраций в контрольной группе были достоверно ниже в аортальных кольцах с сохраненной ПВЖТ, по сравнению с препаратами, где ПВЖТ отсутствовала. Это согласуется как с первыми наблюдениями антисократительного действия ПВЖТ [17] на действие норадреналина, так и с результатами последующих исследований [18]. Выраженность величины антисократительных влияний ПВЖТ в этих исследованиях значительно различалась, что во многом зависело как от вещества, индуцировавшего сократительный ответ гладких мышц сосудов, так и от состава ПВЖТ, окружающей тот или иной тип сосуда. Так, снижение сократительных ответов сосудов с интактной ПВЖТ по сравнению с сосудами без ПВЖТ на действие ангиотензина II, серотонина и фенилэфрина было 95, 80 и 30% соответственно [17]. В ПВЖТ входят преадипоциты, адипоциты и стромально-сосудистая фракция, включающая клетки иммунной системы, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, коллагеновые волокна, фибробласты, нервные волокна, клетки кровеносных и лимфатических сосудов. Качественный и количественный состав этих элементов, а следовательно, и продуцируемых ими веществ, различается в разных частях сосудистого русла. Так, в состав ПВЖТ грудной части аорты входят адипоциты бурой жировой ткани, а ПВЖТ, окружающая брюшную часть аорты и коронарные артерии, представляет собой смесь белой и бурой жировой ткани, а ПВЖТ брыжеечных, бедренных и сонных артерий напоминает белую жировую ткань [19–21]. Учитывая гетерогенность ПВЖТ, в данном исследовании все используемые кольцевые сегменты контрольной и опытной групп были взяты из определенного региона.

Вещества, продуцируемые ПВЖТ, могут оказывать паракринные влияния как на эндотелиальные клетки, стимулируя или ингибируя выработку эндотелий-производных факторов, так и непосредственно на гладкомышечные клетки сосудов. Однако в серии экспериментов, проведенной на деэндотелизированных препаратах и препаратах с неповрежденным эндотелием, при сохранности ПВЖТ достоверной разницы в величине сократительных ответов на применение PhE не было зарегистрировано. В данной работе во всех экспериментах, направленных на выявление прямого влияния факторов, секретируемых ПВЖТ, использовали кольцевые препараты с удаленным эндотелием. Как было отмечено выше, в контрольной группе животных наличие ПВЖТ препятствовало развитию вазоконстрикции, инициированной PhE, тогда как в аортах с сохраненной ПВЖТ и при ее удалении у крыс после диеты достоверного изменения величины сократительных ответов на применение PhE зарегистрировано не было. В то же время исчезновение различий в сократительных ответах препаратов аорты после удаления ПВЖТ у животных контрольной и опытной групп предполагает, что нарушения в реактивности аорты

при метаболическом синдроме связаны, в основном, именно с изменением регуляторной функции ПВЖТ.

Широко известным вазодилататором является NO, продуцируемый эндотелиальными клетками сосудов, и дисфункциональные изменения эндотелия, имеющие место при использовании высокожировой и/или высокоуглеводной диет и отмеченные в значительном количестве работ и, в частности, рассмотренные в обзоре Engin [22], приводят к снижению его продукции. Однако экспрессия эндотелиальной NO-синтазы (eNOS, NOS-3) выявлена не только в клетках эндотелия, но и в других типах клеток, включая адипоциты [23]. Наличие eNOS в ПВЖТ показано в ряде исследований [23–25], но вопрос участия в осуществлении вазорелаксирующего действия NO, продуцируемого ПВЖТ, остается дискутируемым и спорным: от значительного влияния до полного его отсутствия, что частично может быть объяснено различными типами сосудов, используемых в исследованиях. Существуют значительные отличия экспрессии eNOS в ПВЖТ из разных анатомических областей [25]. В проведенном нами исследовании показано, что в грудной части аорты крысы в условиях ингибирования eNOS при инкубации препаратов с L-NAME в контрольной группе происходило усиление сократительных ответов на введение фенилэфрина при сохранности ПВЖТ, которое отсутствовало при удалении ПВЖТ и в сегментах аорты животных после диеты как в присутствии, так и при отсутствии ПВЖТ. Это доказывает, что NO, продуцируемый ПВЖТ, способен оказывать антисократительное действие на гладкие мышцы аорты, хотя его влияние не такое значительное, как у NO эндотелиального происхождения. При метаболических сдвигах, вызванных ДК, это влияние нивелируется, одной из причин чего может являться снижение чувствительности гладких мышц к NO. Результаты данного исследования показывают, что SNP-опосредованная вазодилатация существенно не различалась в контрольной и опытной группах, это свидетельствует о том, что использованная диета не привела к изменению чувствительности гладких мышц сосудов к NO.

Учитывая вовлеченность АТФ-чувствительных калиевых каналов в патофизиологические процессы, происходящие при диабете и ожирении, и важную роль каналов данного типа в релаксации сосудистых гладких мышц, вызванной эндотелиальными факторами, нами проведено исследование изменений сосудистой сократительной активности в условиях их блокады. Еще в одной из первых работ, посвященной изучению антисократительных свойств ПВЖТ [17], было продемонстрировано, что блокада IK_{ATP} -каналов глибенкламидом увеличивала величину сокращений аорты, вызванных серотонином, в присутствии ПВЖТ. Однако результаты, полученные в ряде последующих исследований, отрицали вклад данных каналов при реализации антисократительных свойств ПВЖТ, что особенно убедительно было продемонстрировано на препаратах из брюшной части аорты и брыжеечных сосудах [26]. В настоящей работе у препаратов с интактной ПВЖТ мы наблюдали усиление сократительной активности после блокады IK_{ATP} глибенкламидом как в контрольной группе, так и у животных после диеты, которое хотя и было достоверным, но было весьма слабо выражено. Это возможно объяснить, если согласиться с предположением, основанном на количественной оценке результатов экспериментов с удалением ПВЖТ, которое заключается в том, что глибенкламид противодействует антиконтракtilьному эффекту ПВЖТ посредством неспецифического, независимого от ПВЖТ механизма [27]. Заслуживает внимания факт изменения динамики сократительных ответов на действие PhE после инкубации с глибенкламидом, который требует дальнейших исследований. В отличие от действия глибенкламида инкубация с ТЭА приводил к значительному повышению силы сокращения, индуцированного PhE, кольцевых сегментов с сохраненной ПВЖТ в контрольной, но не в опытной группе. В связи с тем, что ТЭА способен блокиро-

вать как потенциалозависимые, так и несколько типов Ca^{2+} -активируемых каналов как большой, так и промежуточной проводимости, полученные данные свидетельствуют об участии этих каналов в реализации пути антисократительного действия ПВЖТ и потере этой способности после содержания на диете.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в настоящей работе данные показывают, что использование ДК в течение 7 недель вызывает у крыс развитие характерных признаков метаболического синдрома: висцерального ожирения, гипергликемии и гипертриглицеридемии. Продемонстрирована важная функциональная роль ПВЖТ, которая в нормальных условиях заключается в предотвращении повышенной вазоконстрикции, вызванной стимуляцией адренорецепторных структур фенилэфрином. Реализация этого влияния осуществляется с участием потенциалозависимых и/или Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов гладких мышц, в то время как вовлеченность АТФ-чувствительных K^{+} -каналов выражена слабо и не изменяется при метаболических изменениях, обусловленных применением ДК. Продукция и высвобождение NO клетками ПВЖТ представляется существенным компонентом антисократительного влияния этой ткани на аорту крысы. При развитии метаболического синдрома, вызванного ДК, происходит снижение протективного действия ПВЖТ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (Institutional Animal Care and Use Committee – IACUC), протокол №15/02 от 15 февраля 2021 г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации (2019–2030), тема 0134–2019–0001.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор данной статьи сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brant LC, Wang N, Ojeda FM, LaValley M, Barreto SM, Benjamin EJ, Mitchell GF, Vasan RS, Palmisano JN, Münzel T, Blankenberg S, Wild PS, Zeller T, Ribeiro AL, Schnabel RB, Hamburg NM (2017) Relations of Metabolically Healthy and Unhealthy Obesity to Digital Vascular Function in Three Community-Based Cohorts: A Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc* 6: e004199. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004199>
2. Panchal SK, Brown L (2011) Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011: 351982. <https://doi.org/10.1155/2011/351982>
3. Sampey B, Vanhoose AM, Winfield H M, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L (2011) Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 19: 1109–1117. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>
4. Akoumianakis I, Antoniadou C (2017) The interplay between adipose tissue and the cardiovascular system: is fat always bad? *Cardiovasc Res* 113: 999–1008. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx111>

5. Uluoglu C, Zengil H (2003) Comparison of different de-endothelization procedures in the isolated rat thoracic aorta: a short communication. *Res Communicat Mol Pathol Pharmacol* 113-114: 289–297.
6. Lobov GI (2022) Contractile function of the capsule of the bovine mesenteric lymph node at the early stage of inflammation. *J Evol Biochem Physiol* 58(6):2109–2123.
<https://doi.org/10.31857/S0869813922120093>
7. Ramirez I, Friedman MI (1990) Dietary hyperphagia in rats: role of fat, carbohydrate, and energy content. *Physiol Behav* 47: 1157–1163.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90367-d](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90367-d)
8. Oliva L, Aranda T, Caviola G, Fernández-Bernal A, Alemany M, Fernández-López JA, Remesar X (2017) In rats fed high-energy diets, taste, rather than fat content, is the key factor increasing food intake: a comparison of a cafeteria and a lipid-supplemented standard diet. *Peer J* 5: e3697.
<https://doi.org/10.7717/peerj.3697>
9. Zeeni N, Bassil M, Fromentin G, Chaumontet C, Darcel N, Tome D, Daher CF (2015) Environmental enrichment and cafeteria diet attenuate the response to chronic variable stress in rats. *Physiol Behav* 139: 41–49.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.003>
10. Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, Després JP, Gordon-Larsen P, Lavie CJ, Lear SA, Nduemele CE, Neeland IJ, Sanders P, St-Onge MP; American Heart Association Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Epidemiology and Prevention; and Stroke Council (2021) Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 143: e984–e1010.
<https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000973>
11. Foster MT, Shi H, Seeley RJ, Woods SC (2010) Transplantation or removal of intra-abdominal adipose tissue prevents age-induced glucose insensitivity. *Physiol Behav* 101: 282–288.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.05.014>
12. Sena CM, Pereira AM, Seica R (2013) Endothelial dysfunction – a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta* 1832: 2216–2231.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.08.006>
13. Sharma A, Bernatchez PN, de Haan JB (2012) Targeting endothelial dysfunction in vascular complications associated with diabetes. *Int J Vasc Med* 2012: 750126.
<https://doi.org/10.1155/2012/750126>
14. Van de Voorde J, Pauwels B, Boydens C, Decaluwé K (2013) Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism* 62: 1513–1521.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.06.004>
15. Lu SC, Akanji AO (2020) Leptin, Obesity, and Hypertension: A Review of Pathogenetic Mechanisms. *Metab Syndr Relat Disord* 18: 399–405.
<https://doi.org/10.1089/met.2020.0065>
16. Kotanidis CP, Antoniadou C (2021) Perivascular fat imaging by computed tomography (CT): a virtual guide. *Br J Pharmacol* 178: 4270–4290.
<https://doi.org/10.1111/bph.15634>
17. Löhn M, Dubrovskaya G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM (2002) Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J* 16: 1057–1063.
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0024com>
18. Ahmed A, Bibi A, Valoti M, Fusi F (2023) Perivascular Adipose Tissue and Vascular Smooth Muscle Tone: Friends or Foes? *Cells* 12: 1196.
<https://doi.org/10.3390/cells12081196>
19. Li X, Ma Z, Zhu YZ (2021) Regional Heterogeneity of Perivascular Adipose Tissue: Morphology, Origin, and Secretome. *Front Pharmacol* 12: 697720.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.697720>
20. Kim HW, Shi H, Winkler MA, Lee R, Weintraub NL (2020) Perivascular Adipose Tissue and Vascular Perturbation/Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 40: 2569–2576.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.312470>
21. van Dam AD, Boon MR, Berbée JFP, Rensen PCN, van Harmelen V (2017) Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development. *Eur J Pharmacol* 816: 82–92.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.03.051>
22. Engin A (2017) Endothelial Dysfunction in Obesity. *Adv Exp Med Biol* 960: 345–379.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_15
23. Xia N, Horke S, Habermeyer A, Closs EI, Reifensberg G, Gericke A, Mikhed Y, Münzel T, Daiber A, Förstermann U, Li H (2016) Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36: 78–85.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306263>
24. Baltieri N, Guizoni DM, Victorio JA, Davel AP (2018) Protective Role of Perivascular Adipose Tissue in Endothelial Dysfunction and Insulin-Induced Vasodilatation of Hypercholesterol-

- emic LDL Receptor-Deficient Mice. *Front Physiol* 9: 229.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00229>
25. *Victorio JA, Fontes MT, Rossoni LV, Davel AP* (2016) Different Anti-Contractile Function and Nitric Oxide Production of Thoracic and Abdominal Perivascular Adipose Tissues. *Front Physiol* 7: 295.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00295>
 26. *Verlohren S, Dubrovskaya G, Tsang SY, Essin K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M* (2004) Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension* 44: 271–276.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000140058.28994.ec>
 27. *Schleifenbaum J, Köhn C, Voblova N, Dubrovskaya G, Zavaritskaya O, Gloe T, Crean CS, Luft FC, Huang Y, Schubert R, Gollasch M* (2010) Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *J Hypertens* 28: 1875–1882.
<https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833c20d5>

Endothelium-Independent Anti-Contractile Effect of Rat Aorta Perivascular Adipose Tissue at Control and Metabolic Disorders Induced by the Cafe Diet

M. N. Pankova*

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

**e-mail: mpankova@bk.ru*

The use of high-calorie nutrition can lead to morpho-functional changes of the vascular bed that have clinical importance, however, the modulatory effect of perivascular adipose tissue (PVAT) on the vascular system in this process remains poorly characterized. The aim of this work was to study the direct effect of PVAT on the contractile activity of rat aortic smooth muscle in metabolic disorders that occur when using the cafe diet (CD). It was shown that 7 weeks of keeping animals on this diet led to excessive accumulation of visceral adipose tissue, disorders of carbohydrate and lipid metabolism, manifested in the form of hyperglycemia and hypertriglyceridemia, which characterizes the development of the metabolic syndrome. An important functional role of PVAT in the regulation of vascular tone was demonstrated using wire myography on annular without endothelium segments of the thoracic aorta of the rat. In the control group of animals on a standard diet, the presence of PVAT reduced vasoconstriction caused by stimulation by phenylephrine. In the experimental group, in rats with the metabolic syndrome caused by DC, there was a decrease in the protective effect of PVAT. The implementation of this effect was carried out with the participation of voltage-dependent and/or Ca^{2+} -activated K^{+} -channels of smooth muscles, while the involvement of ATP-sensitive K^{+} -channels was weak and independent from metabolic changes caused by the use of CD. Part of the anticontractile effect of PVAT was mediated through nitric oxide (NO) produced by PVAT itself. Under metabolic changes caused by CD, the endothelium-independent anticontractile effect of NO is completely eliminated without changing the sensitivity of vascular smooth muscles to it.

Keywords: perivascular adipose tissue, aorta, vascular smooth muscle, vasodilation, metabolic syndrome, cafe diet, phenylephrine

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ GABARAP И β -III-ТУБУЛИНА В НЕОКОРТЕКСЕ
КРЫС В НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ
ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ**

© 2023 г. Л. И. Хожай*

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

**E-mail: astarta0505@mail.ru*

Поступила в редакцию 17.08.2023 г.

После доработки 28.10.2023 г.

Принята к публикации 30.10.2023 г.

Проведено исследование распределения белка внутриклеточного транспорта GABARAP, ассоциированного с GABA_A-рецептором, и изоформы белка цитоскелета β -III-тубулина в слоях соматосенсорной области неокортекса в неонатальный период у крыс линии Wistar после воздействия гипоксии. В работе использована модель недоношенной беременности человека. Для выявления GABARAP и β -III-тубулина применяли иммуногистохимические методы исследования. Воздействие гипоксии осуществляли на 2-е сутки после рождения в специальной камере с содержанием кислорода в дыхательной смеси 7.8%. Исследование неокортекса проводили на 5- и 10-е сутки. Показано, что у контрольных животных к концу неонатального периода (P10) содержание GABARAP (по плотности окрашивания продукта иммунной реакции) существенно повышается: в верхних слоях II–III в 2, а в глубоких IV–VI в 4 раза по сравнению с более ранним сроком развития (P5). Содержание β -III-тубулина в слоях коры распределяется равномерно. У животных, переживших воздействие гипоксии в неонатальный период, выявлено значительное увеличение содержания GABARAP и β -III-тубулина в верхних слоях неокортекса. Эти изменения происходят на фоне существенного снижения содержания подтипа GABA_A-рецептора (данные получены ранее). GABARAP и β -III-тубулин, а также GABA_A-рецептор, входят в состав комплекса элементов, опосредующих в неокортексе трансмиссию GABA. Гипоксия вызывает изменение содержания этих белков в коре головного мозга, которое может приводить к нарушению тормозных эффектов GABA.

Ключевые слова: GABARAP, β -III-тубулин, неокортекс, неонатальный период, гипоксия

DOI: 10.31857/S086981392312004X, **EDN:** CDVMJR

ВВЕДЕНИЕ

GABARAP (GABA_A receptor-associated protein), белок ассоциированный с GABA_A-рецептором, принадлежит к семейству белков, обеспечивающих процессы белкового внутриклеточного транспорта, играет важную роль в транспорте GABA_A-рецепторов и участвует в формировании пула рецепторов к GABA (γ -аминомасляная кислота) [1, 2]. В головном мозге млекопитающих и человека GABA_A является основным рецептором к GABA при тормозной синаптической нейротрансмиссии [3]. Он имеет пентамерную структуру, образованную комбинацией субъединиц $2\alpha 1$, $2\beta 2$ и $1\gamma 2$ [4], при этом установлено, что GABARAP взаимодействует только с субъедини-

цей $\gamma 2$ [1, 5]. Во время транспорта GABA_A-рецепторов ассоциированный с ним белок GABARAP обеспечивает связь между GABA_A-рецепторами и цитоскелетом. С одной стороны, GABARAP, связываясь с внутриклеточным доменом субъединицы $\gamma 2$, соединяется с GABA_A-рецепторами [1, 2], а с другой, связываясь с β -III-тубулином, взаимодействует с микротрубочками цитоскелета нейронов [1, 6, 7]. Установлено, что внутриклеточный транспорт GABA_A-рецепторов является ключевым компонентом процесса, регулирующего пластичность тормозных синапсов и, как результат, трансмиссию GABA [8]. Есть известные основания считать, что для эффективной тормозной нейротрансдачи и коммуникации нейронов между собой критически необходимым является формирование кластеров рецепторов к GABA на постсинаптической мембране [9]. Образование кластеров рецепторов осуществляется как при участии GABARAP, так и других адаптерных белков, например, гефирина, который является важным элементом, закрепляющим GABA_A-рецепторы на плазматической мембране нейронов, связываясь при этом и с GABARAP, и микротрубочками [5]. В результате ряда проведенных исследований для GABARAP была определена ведущая роль в доставке GABA_A-рецепторов к поверхности клетки и обратно в цитоплазму, организации рецепторов в кластеры и регулировании плотности расположения рецепторов на поверхности нейрона [8, 9]. При всей важности роли, которую выполняет белок GABARAP в процессах внутриклеточного транспорта, особенно в регуляции функции тормозных синапсов, в настоящее время почти ничего не известно о его содержании в неокортексе в неонатальный период (особый период в развитии млекопитающих и человека, когда происходит созревание ЦНС и становление межнейронных связей).

Внутриклеточный транспорт рецепторов и формирование кластеров на постсинаптической мембране являются весьма сложными процессами, требующими координации взаимодействия множества белков, в том числе белков самого цитоскелета, среди которых одним из основных является тубулин. Гетеродимеры тубулина, организованные в линейные протофиламенты, связываясь латерально, образуют полые цилиндрические полимеры (микротрубочки) шириной ~25 нм. [10]. Белки микротрубочек образуют динамический компонент цитоскелета и играют ключевую роль в процессах внутриклеточного везикулярного транспорта белков, подвижности клеток, миграции, митоза [10]. Наблюдения показали, что при ряде нейральных патологий, онкологических заболеваний экспрессия белков микротрубочек существенно нарушается. Поэтому до настоящего времени остается большой интерес к изучению синтеза белков цитоскелета и состояния микротрубочек, являющихся одной из важных мишеней при фармакологической терапии [11]. Вместе с тем в существующей литературе крайне мало сведений о содержании как GABARAP, так и β -III-тубулина, белков, входящих в комплекс элементов, опосредующих функцию торможения в ЦНС, в неокортексе в условиях гипоксии в неонатальный период. То обстоятельство, что клиническая статистика ежегодно регистрирует значительное число случаев перинатальной гипоксии у новорожденных во время родов, является причиной всестороннего исследования ее последствий.

В связи с этим целью данной работы было изучить содержание и распределение белка GABARAP, ассоциированного с GABA_A-рецептором, и изоформы β -III-тубулина, основного белка цитоскелета, в слоях неокортекса крыс, переживших воздействие гипоксии в неонатальный период.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на лабораторных крысах линии Wistar, полученных из ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН” (Санкт-Петербург).

бург). Беременные самки крыс содержались на базе вивария Института при температуре 22–24°C, цикле освещения 12 ч день/ночь и свободном доступе к воде и еде. После рождения потомства исследование проводилось на новорожденных крысах в неонатальный период развития (в возрасте с 2-х по 10-е постнатальные сутки). В работе была использована модель недоношенной беременности человека, включающая общую гипоксию новорожденных крыс. Считается, что развитие мозга крыс на 1–2-е постнатальные сутки соответствует степени развития мозга преждевременно родившихся детей у человека (примерно 29–30-я неделя беременности) [12]. Условия этой модели позволяют получить повреждения мозга, наблюдаемые у недоношенных новорожденных детей при преждевременных родах, как правило, имеющих недоразвитие респираторной системы и отсюда респираторную дисфункцию. Модель, с одной стороны, исключает смертность животных, а с другой, воспроизводит широкий спектр нарушений развития разных отделов головного мозга, возникающих при асфиксии у недоношенных детей человека [12]. В работе исследовали соматосенсорную область неокортекса.

Воздействие гипоксии осуществляли на 2-е неонатальные сутки. Новорожденных крыс помещали на 1 ч в камеру с проточной газовой смесью, содержащей 7.8% кислорода, 0.4% углекислого газа и 91.8% азота, при температуре 21.5–23.0°C и нормальном давлении (760 мм рт. ст.). Исследование неокортекса проводили в неонатальный период (период новорожденности) на 5-е (П5) и 10-е (П10) постнатальные сутки. Использовали 2 группы животных: 1) экспериментальную группу, включающую крыс на П5 и П10 ($n = 8$ в каждом случае), подвергавшихся воздействию гипоксии и 2) контрольную группу, включающую интактных крыс того же возраста на П5 и П10 ($n = 8$ в каждом случае).

Иммуногистохимические методы. У новорожденных крыс мозг извлекали и обрабатывали по общепринятой методике: фиксировали в цинк-этанолформальдегиде на фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), обезвоживали, заливали в парафин и готовили фронтальные серийные срезы толщиной 5–6 мкм на уровне брегмы -0.60 – -0.40 мм (по стереотаксическому атласу координатных таблиц мозга крыс в возрасте П5–П10 [13]). Срезы помещали на предметные стекла Super frost plus gold (Menzel-Glasser, Германия). Иммуногистохимическое выявление белка GABARAP проводили с использованием первичных кроличьих моноклональных антител (recombinant anti-GABARAP antibody клон [EPR4805], ab109299; Abcam, Великобритания) в разведении 1:100. После проведения процедуры демаскирования белков в цитратном буфере (pH 6.1) (Dako, Дания) в течение 25 мин срезы инкубировали в первичных антителах при температуре 4°C в течение 16 ч. В качестве вторичных антител использовали Goat anti-rabbit IgG H&L (HRP, ab6721; Abcam, Великобритания). Срезы помещали во вторичные антитела на 30 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Специфичность иммунной реакции проверяли при помощи негативного контроля (без первичных антител). Иммуногистохимическое выявление β -III-тубулина проводили с использованием первичных кроличьих моноклональных антител к β -III-тубулину (anti-beta-III-Tubulin antibody клон [EP1569Y], ab52623; Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 50. После проведения процедуры демаскирования белков в цитратном буфере (pH 6.1) (Dako, Дания) в течение 30 мин, срезы инкубировали в первичных антителах при температуре 4°C в течение 18 ч. В качестве вторичных антител использовали Goat anti-rabbit IgG H&L (HRP, ab6721; Abcam, Великобритания). Срезы помещали во вторичные антитела на 40 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Специфичность иммунной реакции проверяли при помощи негативного контроля (без первичных антител). Общий морфологический анализ про-

водили на срезах мозга, окрашенных по Нисслию по общепринятой методике. Срезы заключали в синтетическую среду Permaunt (Thermo Scientific, США).

Статистическая оценка результатов. При проведении иммуногистохимической реакции все процедуры были стандартизированы и осуществлялись одновременно для гистологических срезов мозга, полученных от контрольных и подопытных животных обеих возрастных групп. Материал анализировали на цифровых изображениях фронтальных серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия). Оценку плотности окрашивания продукта иммунной реакции осуществляли при помощи системы анализа изображений, включающей световой микроскоп Olympus CX31 (Япония), цветную цифровую камеру Video/Zavr Standart VZ-C31Sr и программное обеспечение (для денситометрии) Видеозавр Мультиметр 2.3 (ООО АТМ-практика, Санкт-Петербург). Анализ плотности окрашивания продукта иммунной реакции проводили при увеличении объектива микроскопа $\times 60$. Цифровые изображения срезов мозга контрольных и экспериментальных животных были получены при одинаковых параметрах освещения, насыщенности цвета и контраста. Для оценки плотности окрашивания продукта иммунной реакции выделяли участки окрашенной цитоплазмы клеток, участки окрашенных проксимальных отделов отростков, крупных гранул в нейропиле, которые считаются терминальными синаптическими структурами [14]. Количественный анализ данных осуществляли на цифровых изображениях, полученных с 15 гистологических срезов мозга животных каждой исследуемой группы, при этом на каждом срезе изучали по 7–10 участков в каждом из слоев II–VI неокортекса. Обработанные данные, выраженные в усл. ед. D (плотность окраски продукта иммунной реакции), представлены как средние значения и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Для сравнения полученных результатов между разными группами животных использовали *t*-критерий Стьюдента и oneway ANOVA (Statistica 8.0, Statsoft Inc. США), различия считали статистически достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Распределение белка GABARAP в неокортексе крыс на 5-е неонатальные сутки в контроле и после воздействия гипоксии

У контрольных животных на П5 в неокортексе в верхних слоях II–III нейроны небольшого размера, образующие эти слои, в своем большинстве имеют либо полностью гомогенно иммуноокрашенную цитоплазму, либо ее часть. Кроме того, присутствуют иммунопозитивные гранулы, расположенные вокруг ядра, в перинуклеарном пространстве и на периферии клетки ближе к поверхности клетки (рис. 1a, b).

Плотность окрашивания продукта реакции на GABARAP в цитоплазме равна 0.160 ± 0.06 (табл. 1). В нейропиле присутствует сеть тонких терминалей и крупных отростков, имеющих варикозные расширения. Продукт иммунной реакции выявляется в проксимальных отделах отростков, плотность его окрашивания значительно превышает значение в цитоплазме нейронов (табл. 1). В глубоких слоях IV–VI в цитоплазме нейронов присутствуют иммуноокрашенные гранулы, расположенные или в перинуклеарном пространстве, или на периферии цитоплазмы клетки. Плотность окрашивания продукта иммунной реакции на GABARAP здесь ниже, чем в цитоплазме нейронов верхних слоев (табл. 1).

В нейропиле видна тонкая сеть терминальных отростков и крупные отростки, в которых также присутствует окрашенный продукт иммунной реакции. На поверхности отростков определяются иммуноположительные гранулы. Плотность продукта иммунной реакции на GABARAP в отростках нейронов глубоких слоев по-

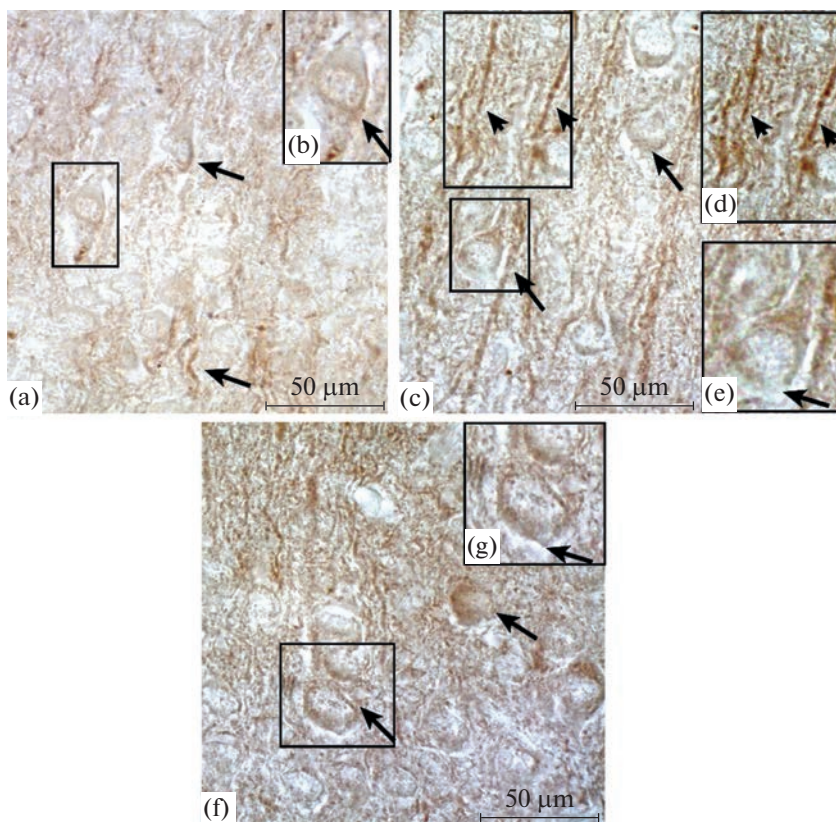


Рис. 1. Соматосенсорная область неокортекса крысы (верхние слои II–III) на P5 (a) и P10 (c, f); увеличенные фрагменты отдельных нейронов и отростков (b, d, e, g). Иммуногистохимическая реакция на выявление GABARAP. (a), (c) – повышение плотности окрашивания продукта иммунной реакции в неокортексе у контрольных животных во время неонатального периода (от P5 до P10) в цитоплазме нейронов (длинные стрелки) и отростках (короткие стрелки); (f) – значительное повышение плотности окрашивания продукта иммунной реакции в нейронах (длинные стрелки) на P10 после воздействия перинатальной гипоксии. Увел. ок. $\times 100$.

Таблица 1. Показатели оптической плотности (D) продукта иммунной реакции при выявлении белка GABARAP в слоях соматосенсорной области неокортекса крыс на 5-е и 10-е неонатальные сутки в контроле и после воздействия гипоксии (в у. е.)

Слои	D (у. е.)			
отростки	P5 (контроль)	P10 (контроль)	P5 (гипоксия)	P10 (гипоксия)
II–III	0.160 ± 0.06	0.307 ± 0.07	0.177 ± 0.05	$0.886 \pm 0.06^*$
Отростки (II–III)	0.271 ± 0.04	0.361 ± 0.05	0.252 ± 0.06	$0.259 \pm 0.07^*$
IV–VI	0.125 ± 0.09	0.492 ± 0.06	$0.431 \pm 0.08^*$	0.458 ± 0.04
Отростки(IV–VI)	0.289 ± 0.07	0.388 ± 0.05	$0.346 \pm 0.06^*$	$0.473 \pm 0.08^*$

* – различия значений по сравнению с контрольной группой достоверны при $p < 0.05$.

что соответствует таковой в отростках верхних слоев, при этом оказывается значительно выше, чем в цитоплазме нейронов (табл. 1). После воздействия гипоксии в верхних слоях II–III цитоплазма нейронов имеет меньший объем, чем в контроле, и представляет собой ободок, окружающий ядро, в котором видны иммунопозитивные гранулы, располагающиеся вокруг ядра. Плотность иммунного окрашивания продукта реакции на GABARAP почти не изменяется по сравнению с контролем (табл. 1). В нейропиле, как и у контрольных животных, присутствуют отростки и сеть тонких терминалей. В отростках выявляется продукт иммунной реакции с плотностью окрашивания, соответствующей контрольному значению (табл. 1). Иммунопозитивные гранулы на отростках присутствуют, но их меньше, чем в контроле. В глубоких слоях IV–VI цитоплазма нейронов также представлена небольшим объемом и также содержит гранулы, локализующиеся вокруг ядра. В цитоплазме нейронов плотность иммунного окрашивания продукта реакции на GABARAP значительно превышает таковую в контроле (табл. 1). В нейропиле крупные отростки имеют варикозные расширения, иммунопозитивных гранул на поверхности отростков меньше, чем в контроле. При этом плотность иммунного окрашивания продукта реакции на GABARAP в отростках нейронов глубоких слоев существенно превышает контрольное значение (табл. 1). Таким образом, у контрольных животных на П5 в верхних слоях II–III содержание GABARAP (по плотности окрашивания продукта реакции) выше, чем в глубоких слоях IV–VI. В отростках всех слоев неокортекса содержание GABARAP почти в 2 раза выше, чем в цитоплазме нейронов. У животных, переживших перинатальную гипоксию, в верхних слоях II–III содержание GABARAP почти не изменяется по сравнению с контролем, однако в глубоких слоях оно значительно повышается: в цитоплазме нейронов в 3.4 раза, а в отростках в 1.2 раза.

Распределение белка GABARAP в неокортексе крыс на 10-е неонатальные сутки в контроле и после воздействия гипоксии

У контрольных животных на П10 в неокортексе в верхних слоях II–III в цитоплазме нейронов иммуноположительные гранулы локализуются в перинуклеарном пространстве, вокруг ядра, либо по всей цитоплазме. Плотность окрашивания продукта реакции была значительно выше, чем на П5 (табл. 1). В нейропиле видна сеть тонких терминалей и крупные отростки с гранулами на поверхности (рис. 1с, d, e). Плотность окрашивания продукта реакции на GABARAP в отростках также выше, чем на П5 (табл. 1). В цитоплазме нейронов глубоких слоев IV–VI локализация иммуноположительных структур такая же. Плотность окрашивания продукта реакции на GABARAP значительно повышается (почти в 4 раза) (табл. 1). В нейропиле проксимальные части крупных отростков и гранулы также иммуноположительны, плотность окрашивания продукта реакции также выше, чем на П5 (табл. 1). После воздействия гипоксии к концу неонатального периода (П10) в верхних слоях II–III цитоплазма нейронов содержит иммуноположительные гранулы, локализующиеся в перинуклеарном пространстве и на периферии клеток. Здесь плотность окрашивания продукта реакции на GABARAP по сравнению с контролем повышается значительно (табл. 1) (рис. 1f, g). В нейропиле плотность окрашивания продукта реакции в крупных отростках по сравнению с контролем снижается (табл. 1). В глубоких слоях IV–VI в цитоплазме нейронов локализация продукта иммунной реакции на GABARAP аналогичная, однако плотность его окрашивания несколько снижается (табл. 1). В нейропиле в крупных отростках и иммунопозитивных гранулах плотность окрашивания продукта иммунной реакции на GABARAP выше, чем в контроле (табл. 1). Таким образом, к концу неонатального периода у контрольных животных как в верхних, так и в глубоких слоях в цитоплазме нейронов и в отрост-

Таблица 2. Показатели оптической плотности (D) продукта иммунной реакции при выявлении белка β -III-тубулина в слоях соматосенсорной области неокортекса крыс на 5-е и 10-е неонатальные сутки в контроле и после воздействия гипоксии (в у. е.)

Слои	D (у. е.)			
	П5 (контроль)	П10 (контроль)	П5 (гипоксия)	П10 (гипоксия)
II–III	0.156 $\pm$ 0.08	0.148 $\pm$ 0.07	0.198 $\pm$ 0.04*	0.179 $\pm$ 0.05*
IV–VI	0.332 $\pm$ 0.04	0.150 $\pm$ 0.05	0.162 $\pm$ 0.06	0.137 $\pm$ 0.08

* – различия по отношению к контрольной группе достоверны при $p < 0.05$.

ках содержание GABARAP (по плотности окрашивания продукта реакции) возрастает (почти в 2 и 4; 1.3 и 1.3 раза соответственно) по сравнению с таковым на более раннем сроке (П5). После воздействия гипоксии к концу неонатального периода в цитоплазме нейронов верхних слоев содержание GABARAP значительно увеличивается (в 3 раза) по сравнению с контролем. При этом в глубоких слоях в цитоплазме нейронов оно почти не изменяется.

Распределение β -III-тубулина в неокортексе крыс на 5-е неонатальные сутки в контроле и после воздействия гипоксии

У контрольных животных на П5 во всех слоях неокортекса цитоплазма нейронов иммуноположительна на β -III-тубулин. Она имеет практически равномерное окрашивание, однако на периферии часто встречаются более интенсивно иммуноокрашенные гранулы. При этом плотность окрашивания продукта иммунной реакции на β -III-тубулин в слоях II–III ниже, чем в IV–VI (табл. 2). После воздействия гипоксии в верхних слоях II–I II цитоплазма нейронов гомогенна, а плотность окрашивания продукта иммунной реакции на β -III-тубулин существенно повышается по сравнению с контролем (в 1.3 раза) (рис. 2а, б).

В глубоких слоях IV–VI цитоплазма нейронов может быть окрашена неодинаково: только ее часть, или окрашена полностью, но в ней присутствуют мелкие темные гранулы. Плотность окрашивания продукта иммунной реакции на β -III-тубулин здесь ниже (в 2 раза), чем в контроле (табл. 2).

Распределение β -III-тубулина в неокортексе крыс на 10-е неонатальные сутки в контроле и после воздействия гипоксии

У контрольных животных на П10 в неокортексе в верхних слоях II–III цитоплазма нейронов практически полностью иммуноокрашена, окраску имеют и отростки, на которых локализуются иммуноположительные гранулы. Плотность окрашивания продукта иммунной реакции на β -III-тубулин соответствует таковой на П5, а в глубоких слоях IV–VI она в 2 раза ниже, чем на П5 (табл. 2). После воздействия гипоксии в верхних слоях II–III цитоплазма нейронов и отростков иммуноокрашена равномерно. Плотность окрашивания продукта иммунной реакции на β -III-тубулин в верхних слоях существенно выше, чем в контроле (табл. 2) (рис. 2с, d).

В глубоких слоях IV–VI плотность окрашивания продукта иммунной реакции не изменяется и примерно соответствует контрольному значению (табл. 2). Таким образом, у контрольных животных на П5 в цитоплазме нейронов верхних слоев содержание β -III-тубулина (по плотности окрашивания продукта иммунной реакции) в 2 раза меньше, чем в глубоких. К концу неонатального периода (П10) в глубоких слоях содержание β -III-тубулина снижается в 2 раза и, таким образом, становится одинаковым во всех слоях неокортекса. После воздействия гипоксии в

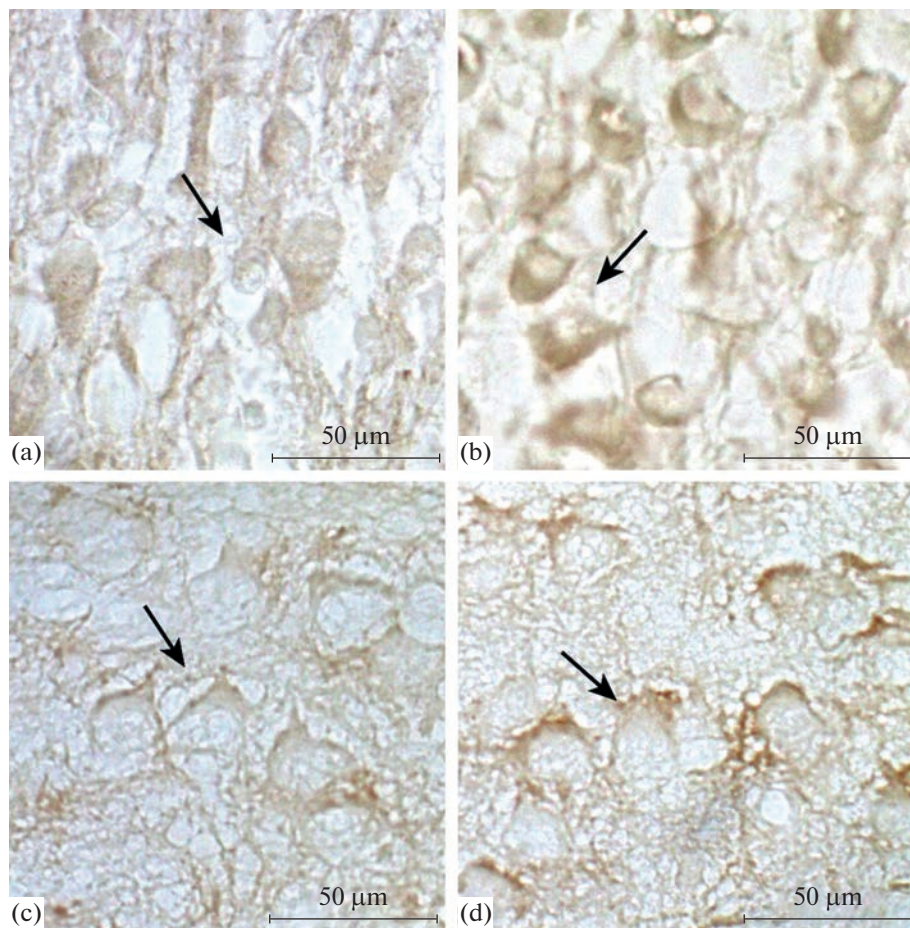


Рис. 2. Соматосенсорная область неокортекса крысы (верхние слои II–III) на P5 (a), (b) и P10 (c), (d). Иммуногистохимическая реакция на выявление β -III-тубулина. (a), (c) – контроль; (b), (d) – повышенные плотности окрашивания продукта иммунной реакции на β -III-тубулин в цитоплазме нейронов (стрелки) после воздействия перинатальной гипоксии. Увел. ок. $\times 100$.

верхних слоях неокортекса содержание β -III-тубулина к P5 повышается в 1.3 раза по сравнению с контролем и остается повышенным до конца неонатального периода. При этом в глубоких слоях содержание β -III-тубулина не изменяется и соответствует контрольному значению.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования показали, что в неонатальный период у контрольных животных в слоях неокортекса GABARAP белок, ассоциированный с GABA_A-рецептором, имеет особенности в распределении. На P5 в верхних слоях II–III содержание GABARAP (по плотности окрашивания продукта иммунной реакции) было выше, чем в глубоких IV–VI. Следует отметить, что формирование верхних и глубоких слоев в неокортексе происходит одновременно. У грызунов после рождения миграция молодых нейронов в верхние слои неокортекса продол-

жается и заканчивается только к П7. Нейроны глубоких слоев к этому времени достигают более высокой степени дифференцировки [15]. Можно предположить, что на этом сроке неонатального периода разное содержание белка GABARAP в верхних слоях (образующихся позже) и глубоких слоях (образующихся раньше) имеет место из-за различной степени развития нейронов и протекания в них внутриклеточных процессов, связанных с созреванием нейронов, развитием эндоплазматического ретикулула, ростом отростков и формированием нейрита [15–17].

В недавней нашей работе, проведенной в аналогичных экспериментальных условиях, при исследовании распределения подтипа GABA_Aα1-рецептора, в комплекс субъединиц которого входит как α1, так и γ2, было показано, что в верхних слоях содержание этого подтипа GABA_Aα1-рецептора также было выше, чем в глубоких [18], что согласуется с выше высказанным предположением.

Выявлено, что у контрольных животных к концу неонатального периода (П10) содержание белка GABARAP (по плотности окрашивания продукта иммунной реакции) во всех слоях неокортекса, как в цитоплазме нейронов, так и в отростках значительно увеличивается: в цитоплазме нейронов верхних слоев II–III почти в 2 раза, в глубоких — в 4 раза, а в отростках — в 1.3. Имеющиеся факты свидетельствуют о том, что к концу неонатального периода (П10) в глубоких слоях неокортекса содержание подтипа GABA_Aα1-рецептора также существенно увеличивается [18].

Повышение содержания белка GABARAP и подтипа GABA_Aα1-рецептора [18] в слоях на П10 совпадает с началом активного синаптогенеза и развития нейрита [15–17]. Таким образом, в продолжении неонатального периода у контрольных крыс содержание внутриклеточного транспортного белка GABARAP увеличивается одновременно с повышением содержания этого подтипа GABA_A-рецептора, этот факт косвенно согласуется с утверждением, что в нейронах неокортекса содержание GABARAP коррелирует с содержанием подтипа GABA_A-рецептора. Аналогичные данные были получены при исследовании нейронов гиппокампа. Повышение уровня экспрессии GABARAP приводило к увеличению количества GABA_A-рецепторов, обнаруживаемых на плазматической мембране нейронов [7].

Результаты показали, что воздействие перинатальной гипоксии вызывает существенное повышение содержания белка GABARAP в глубоких слоях (на П5): в цитоплазме нейронов — в 3.4 раза, а в отростках — в 1.2 раза. К концу неонатального периода (П10) воздействие гипоксии приводило к значительному увеличению содержания GABARAP в верхних слоях: в цитоплазме нейронов — в 3 раза, а в отростках — в 1.4 по сравнению с контролем. Что касается содержания подтипа GABA_Aα1-рецептора, то после воздействия гипоксии на исследованных постнатальных сроках (П5 и П10) во всех слоях неокортекса оно постепенно снижается (в 2.4 раза) [18]. Существенное повышение содержания белка GABARAP в неокортексе и снижение содержания GABA_Aα1-рецептора после воздействия гипоксии [18] дает основание предполагать, что в неонатальный период GABARAP может выполнять и другие функции.

Известно, что GABARAP принадлежит к семейству белков, которые участвуют в различных процессах внутриклеточного белкового транспорта, в том числе в процессах аутофагии, характеризующейся деградацией и утилизацией собственного материала клетки при помощи лизосомного аппарата. Это сложный процесс, включающий деятельность большого количества адаптерных белков, в результате которого происходит формирование аутофагосомы, необходимой для утилизации и рециркуляции агрегированных белков и поврежденных органелл, образующихся при воздействии гипоксии, белковом голодании, эндоплазматическом стрессе [19, 20]. Считают, что аутофагия играет важную роль в метаболизме клеток млекопитающих и человека и необходима для нормальной физиологии нейронов и их выжива-

ния. Так, показано, что присутствие в цитоплазме поврежденных органелл и белков снижает функциональную активность нейронов. Например, локальный биогенез аутофагосом происходит вблизи синапсов как у поверхности клеточной мембраны нейронов, так и в отростках, при этом выявлено, что биогенез аутофагосом связан с состоянием нейронов [21–26]. Нарушение процессов аутофагии вблизи синапсов приводит к накоплению поврежденных белков и органелл и, как результат, к дисфункции синапсов, а впоследствии и к нейродегенеративным заболеваниям, включая болезнь Паркинсона [25, 27–29]. С другой стороны, аутофагия может действовать как адаптивный механизм, обеспечивающий выживание и продолжение жизни клеток в условиях гипоксического или метаболического стресса за счет использования клеточных материалов в качестве питательных веществ. У млекопитающих существует ряд белков, участвующих в формировании, внутриклеточном транспорте и слиянии аутофагосом и лизосом, среди которых присутствуют GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 [30]. В данной работе существенное повышение содержания GABARAP в неокортексе после воздействия перинатальной гипоксии может быть вызвано активацией процессов аутофагии в ответ на появление поврежденных органелл и эндоплазматического ретикула. Более того, наличие непосредственной, а также и отсроченной гибели нейронов после воздействия перинатальной гипоксии свидетельствует о значительных повреждениях клеточных структур [31, 32].

Что касается внутриклеточной локализация белка GABARAP, то результаты работы показали, что GABARAP иммуноцитохимически выявляется во внутриклеточном перинуклеарном кольце, в цитоплазме и на периферии цитоплазмы у клеточной мембраны. Эти места локализации совпадают с таковыми, выявленными в исследовании, проведенном с использованием флуоресцентной метки для GABARAP, а также GABARAP был обнаружен точно в меченных GAD65 синаптических контактах на поверхности нейронов [7].

Высокий уровень экспрессии GABARAP был зарегистрирован в нейронах гиппокампа [33]. Здесь обнаружена колокализация GABARAP и субъединицы $\gamma 2$ GABA_A-рецептора, локализующихся преимущественно в перинуклеарной области цитоплазмы и в проксимальных областях дендритов [7, 33]. Электронно-микроскопическое исследование показало, что GABARAP присутствует на мембранах цистерн аппарата Гольджи [34], что в общем согласуется с перинуклеарным паттерном его локализации в цитоплазме нейронов [7]. В проведенном исследовании окрашивание продукта иммунной реакции на GABARAP также было выявлено в проксимальных отделах дендритов нейронов и точечное иммунное окрашивание на поверхности отростков. Эти места локализации GABARAP совпадают с таковыми, обнаруженными другими авторами [7]. В ряде работ исследователями были установлены определенные функции, выполняемые GABARAP в ЦНС, это – доставка GABA_A-рецепторов к поверхности клетки и обратно, организация их в кластеры на постсинаптической мембране и, таким образом, регулирование плотности рецепторов на поверхности нейронов. При этом формирование кластеров GABA_A-рецепторов, как полагают, способствует быстрой синаптической нейротрансмиссии [5, 8]. Однако происходит ли увеличение синтеза GABARAP при формировании кластеров рецепторов, равно как и сами механизмы, опосредующие образование кластеров, в настоящее время до конца не ясно [6].

Существует утверждение, что GABARAP, β -III-тубулин и GABA_A-рецепторы входят в состав одного функционального комплекса. GABARAP связывается с белком цитоскелета – β -III-тубулином, образующим микротрубочки, и с актиновыми микрофиламентами [1], то есть предполагают, что цитоскелет также участвует в пе-

реносе, закреплении и образовании кластеров GABA_A-рецепторов, при этом считают, что в этих процессах GABARAP выполняет функцию линкерного белка [6].

Результаты проведенного исследования показали, что у контрольных животных содержание β -III-тубулина в разных слоях неокортекса в течение неонатального периода изменяется. На П5 в цитоплазме нейронов верхних слоев II–III содержание β -III-тубулина в 2 раза ниже, чем в глубоких. К концу неонатального периода (П10) в верхних слоях II – III содержание β -III-тубулина не изменяется, в глубоких слоях IV–VI снижается в 2 раза и, таким образом, к концу неонатального периода β -III-тубулин во всех слоях неокортекса распределяется равномерно.

β -III-тубулин, начиная со стадий раннего нейrogenеза, высоко экспрессируется в развивающейся центральной нервной системе. Было выявлено, что микротрубочки, содержащие β -III-тубулин, с которым взаимодействует GABARAP, более динамичны, чем те, которые образованы другими изоформами β -тубулина, и их количество изменяется в зависимости от степени дифференцировки или состояния нейронов [35].

Было показано, что у крыс и мышей экспрессия β -III-тубулина повышается в периоды созревания нейронов и роста аксонов, а затем, по мере их созревания, постепенно снижается [36–38].

Вероятно, у контрольных животных на П5 повышенное содержание β -III-тубулина в глубоких слоях IV–VI связано с активными процессами роста нейронов, развития аксонов и нейрита. В верхних слоях II–III, образовавшихся позже, процессы созревания нейронов, вероятно, отстают по времени от таковых, происходящих в глубоких слоях.

Результаты работы показали, что воздействие гипоксии приводит к повышению содержания β -III-тубулина в верхних слоях II – III неокортекса на П5, которое сохраняется таковым до конца неонатального периода, при этом в глубоких слоях содержание β -III-тубулина не изменяется и соответствует контрольному значению. В существующей литературе имеются весьма противоречивые данные по поводу экспрессии β -III-тубулина при воздействии гипоксии и нейральной патологии. В исследовании, проведенном на грызунах, было показано, что воздействие гипоксии приводило к существенному снижению белков нейрофиламентов, однако количество β -III-тубулина не изменялось [39]. В другой работе после воздействия хронической гипоксии в префронтальной коре крыс было выявлено значительное снижение содержания β -III-тубулина [40].

При исследовании экспрессии β -III-тубулина у крыс в модели хронической эпилепсии и в образцах височной области коры у пациентов с височной эпилепсией, было обнаружено увеличение экспрессии β -III-тубулина. На модели эпилептических приступов, индуцированных киндлингом, наблюдали увеличение экспрессии GABA_A-рецепторов и снижение экспрессии β -III-тубулина, а у крыс на модели спонтанно-рецидивирующих эпилептических приступов, наоборот, было выявлено повышение экспрессии β -III-тубулина, сопровождающееся снижением экспрессии GABA_A-рецепторов, при этом была выявлена связь между эндогенным β -III-тубулином, белком GABARAP и GABA_A-рецепторами в мозге животных с эпилепсией [35]. Ранее выявленное нами снижение содержания GABA_A-рецепторов во всех слоях неокортекса после воздействия перинатальной гипоксии [18] сочетается с повышением содержания β -III-тубулина, что согласуется с данными, полученными в модельных экспериментах спонтанно-рецидивирующей эпилепсии [35].

Вероятно, для выяснения вопроса о реакции процесса синтеза β -III-тубулина в ответ на воздействие повреждающих факторов необходимы дополнительные исследования. Таким образом, результаты проведенной работы выявили новые факты распределения белка внутриклеточного транспорта GABARAP, ассоциирован-

ного с GABA_A-рецепторами, и изоформы белка цитоскелета β -III-тубулина в слоях неокортекса в период раннего онтогенеза. У контрольных животных к концу неонатального периода содержание GABARAP в слоях неокортекса существенно повышается и коррелирует с содержанием подтипа GABA_A-рецептора [18]. При этом содержание β -III-тубулина в слоях коры к концу неонатального периода распределяется равномерно.

Воздействие гипоксии в неонатальный период изменяет содержание элементов функционального комплекса (GABARAP, β -III-тубулина и подтипа GABA_A-рецептора), опосредующих в неокортексе трансмиссию GABA, нарушение которой может быть причиной энцефалопатий, возникающих у детей, перенесших асфиксию во время преждевременных родов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных при соблюдении требований Директив Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании лабораторных животных, а также требованиям Комиссии по биоэтике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Протокол этического комитета Института физиологии им. И.П. Павлова РАН № 10/14 от 14.10.2022 г.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-015-00052/22).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW (1999) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397 (6714): 69–72. <https://doi.org/10.1038/16264>
2. Nymann-Andersen J, Wang H, Chen L, Kittler J., Moss SJ, Olsen RW (2002) Subunit specificity and interaction domain between GABA_A receptor-associated protein (GABARAP) and GABA_A receptors. *J Neurochem* 80: 815–823.
3. Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17: 569–602. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.003033>
4. McKernan RM, Whiting PJ (1996) Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19: 139–143. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(96\)80023-3](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(96)80023-3)
5. Kneussel M, Haverkamp D, Fuhrmann JC, Wang H, Wassle H, Olsen RW, Betz H (2000) The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc Nat Acad Sci U S A* 97 (15): 8594–8599. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8594>
6. Wang H, Olsen RW (2000) Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAP-GABA(A) receptor interaction. *J Neurochem* 75(2): 644–655. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750644.x>
7. Leil TA, Chen Z-W, Chang C-SS, Olsen RW (2004) GABA_A receptor-associated protein traffics GABA_A receptors to the plasma membrane in neurons. *J Neurosci* 24(50): 11429–11438. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3355-04.2004>
8. Coyle JE, Nikolov DB (2003) GABARAP: lessons for synaptogenesis. *Neuroscientist* 9: 205–216. <https://doi.org/10.1177/1073858403009003013>

9. Kneussel M, Betz H (2000) Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci* 23(9): 429–435.
[https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01627-1](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01627-1)
10. Amos LA (2000) Focusing-in on microtubules. *Curr Opin in Structural Biol* 10(2): 236–224.
[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00070](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00070)
11. La Regina G, Coluccia A, Naccarato V, Silvestri R (2019) Towards modern anticancer agents that interact with tubulin. *Eur J Pharm Sci* 131: 58–68.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.01.028>
12. Otellin VA, Khozhai LI, Shishko TT, Vershinina EA (2021) Nucleolar ultrastructure in neurons of the rat neocortical sensorimotor area during the neonatal period after perinatal hypoxia and its pharmacological correction. *J Evol Biochem Physiol* 57: 1251–1256.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021060053>
13. Khazipov R, Zaynutdinova D, Ogievetsky E, Valeeva G, Mitrukhina O, Manent J-B, Represa A (2015) Atlas of the postnatal rat brain in stereotaxic coordinates. *Front Neuroanat* 9: 161.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00161>
14. Guthmann A, Fritschy JM, Ottersen OP, Torp R, Herbert H (1998) GABA, GABA transporters, GABAA-receptor subunits and GAD mRNAs in the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei. *J Comp Neurol* 400(2): 229–243.
15. Marin-Padilla M (1992) Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. *J Comp Neurol* 321: 223–240.
<https://doi.org/10.1002/cne.903210205>
16. Ignacio MP, Kimm EJ, Kageyama GH, Yu J, Robertson RT (1995) Postnatal migration of neurons and formation of laminae in rat cerebral cortex. *Anat Embryol (Berl)* 191: 89–100.
<https://doi.org/10.1007/BF00186782>
17. Hou J, Eriksen N, Pakkenberg B (2011) The temporal pattern of postnatal neurogenesis found in the neocortex of the Gottingen minipig brain. *Neuroscience* 195: 176–179.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.025>
18. Хожай ЛИ (2023) Влияние перинатальной гипоксии (асфиксии) на распределение субъединицы $\alpha 1$ GABA_A-рецептора в неокортексе новорожденных крыс. *Цитология* 65: 32–41. [Khozhai LI (2023) Effect of perinatal hypoxia (asphixia) on the distribution of the $\alpha 1$ GABA_A-receptor subunit in the neocortex of newborn rats. *Cytology* 65: 32–41. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S004137712305005X>
19. Lee Y-H, Kim J, Park K, Lee M-S (2019) β -cell autophagy: mechanism and role in β -cell dysfunction. *Mol Metab* 27: 92–103.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.06.014>
20. Kong F-J, Wu J-H, Sun S-Y, Zhou J-Q (2017) The endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway is involved in cholesterol-induced pancreatic β -cell injury. *Scient Rep* 7: 44746.
<https://doi.org/10.1038/srep44746>
21. Tehran DA, Kuijpers M, Haucke V (2018) Presynaptic endocytic factors in autophagy and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 48: 153–159.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.12.018>
22. Kulkarni A, Chen J, Maday S (2018) Neuronal autophagy and intercellular regulation of homeostasis in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 51: 29–36.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.008>
23. Liang Y, Sigrist S (2018) Autophagy and proteostasis in the control of synapse aging and disease. *Curr Opin Neurobiol* 48: 113–121.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.12.006>
24. Stavoe AKH, Holzbaur ELF (2019) Axonal autophagy: Mini-review for autophagy in the CNS. *Neurosci Lett* 697: 17–23.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.025>
25. Katsumata K, Nishiyama J, Inoue T, Mizushima N, Takeda J, Yuzaki M (2010) Dynein- and activity-dependent retrograde transport of autophagosomes in neuronal axons. *Autophagy* 6: 378–385.
<https://doi.org/10.4161/auto.6.3.11262>
26. Hill SE, Kauffman KJ, Krout M, Richmond JE, Melia TJ, Colon-Ramos DA (2019) Maturation and clearance of autophagosomes in neurons depends on a specific cysteine protease isoform, ATG-4.2. *Devel Cell* 49: 251–266.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.02.013>
27. Maday S, Wallace KE, Holzbaur EL (2012) Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol* 196: 407–417.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201106120>
28. Zawodszky E, Seaman MN, Moreau K, Jimenez-Sanchez M, Breusegem SY, Harbour ME, Rubinsztein DC (2014) Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nat Commun* 5: 3828.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4828>

29. Hoffmann S, Orlando M, Andrzejak E, Bruns C, Trimbuch T, Rosenmund C, Garner CC, Ackermann F (2019) Light-Activated ROS Production Induces Synaptic Autophagy. *J Neurosci* 39: 2163–2183.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1317-18.2019>
30. Joachim J, Tooze SA (2018) Control of GABARAP-mediated autophagy by the Golgi complex, centrosome and centriolar satellites. *Biol Cell* 110: 1–5.
<https://doi.org/10.1111/boc.201700046>
31. Otellin VA, Khozhai LI, Vataeva LA (2012) Effect of hypoxia in early perinatal ontogenesis on behavior and structural characteristics of the rat brain *J Evol Biochem Physiol* 48: 467–473.
32. Отеллин ВА, Хожай ЛИ, Ватаева ЛА, Шишко ТТ (2011) Отдаленные последствия воздействия гипоксии в перинатальный период развития на структурно-функциональные характеристики мозга у крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 97: 1092–1100. [Otellin VA, Khozhai LI, Vataeva LA, Shishko TT (2011) Long-term effects of exposure to hypoxia in perinatal development on structural and functional characteristics of the brain in rats. *Russ J Physiol* 97: 1092–1100. (In Russ)].
33. Okazaki N, Yan J, Yuasa S, Ueno T, Kominami E, Masuho Y, Koga H, Muramatsu M (2000) Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. *Mol Brain Res* 85(1–2): 1–12.
[https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00218](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00218)
34. Kittler JT, Rostaing P, Schiavo G, Fritschy JM, Olsen R, Triller A, Moss SJ (2001) The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol Cell Neurosci* 18(1): 13–25.
<https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1005>
35. Xu X, Shangguan Y, Lu S, Wang W, Du C, Xiao F, Hu Y., Luo J, Wang L, He C, Yang Y, Zhang Y, Lu X, Yang Q, Wang X (2017) Tubulin β -III modulates seizure activity in epilepsy. *J Pathology* 242 (3): 297–308.
<https://doi.org/10.1002/path.4903>
36. Jiang Y Q, Oblinger M M (1992) Differential Regulation of β III and Other Tubulin Genes during Peripheral and central Neuron Development. *J Cell Sci* 103 (Pt 3): 643–651.
<https://doi.org/10.1242/jcs.103.3.643>
37. Latremoliere A, Cheng L, DeLisle M, Wu C, Chew S, Hutchinson EB, Sheridan A, Alexandre C, Latremoliere F, Sheu S-H, Golidy S, Omura T, Huebner EA, Fan Y, Whitman MC, Nguyen E, Hermawan C, Pierpaoli C, Tischfield MA, Clifford J, Woolf CJ, Engle EC (2018) Neuronal-specific TUBB3 is not required for normal neuronal function but is essential for timely axon regeneration. *Cell Rep* 24 (7): 1865–1879.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.029>
38. Hausrat TJ, Radwitz J, Lombino FL, Breiden P, Kneussel M (2021) Alpha- and β -tubulin isoforms are differentially expressed during brain development. *Develop Neurobiol* 81(3): 333–350.
<https://doi.org/10.1002/dneu.22745>
39. Mink RB, Johnston JA (2000) Changes in brain neurofilament and beta-tubulin proteins after cerebral hypoxia-ischemia in rabbits. *Pathobiology* 68 (1): 43–52.
<https://doi.org/10.1159/000028114>
40. Shen Y, Yu L-C (2008) Potential protection of curcumin against hypoxia-induced decreases in beta-III tubulin content in rat prefrontal cortical neurons. *Neurochem Res* 33: 2112–2117.
<https://doi.org/10.1007/s11064-008-9720-y>

Distribution of GABARAP and β -III-tubulin Proteins in the Rats Neocortex in the Neonatal Period after Exposure to Perinatal Hypoxia

L. I. Khozhai*

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

*e-mail: astarta0505@mail.ru

The content of the intracellular transport protein GABARAP associated with the GABA_A-receptor and the isoform of the cytoskeletal protein β -III-tubulin in the layers of the somatosensory area of the neocortex in the neonatal period in Wistar rats after exposure to hypoxia was studied. The model of human preterm pregnancy was used in the work. Immunohistochemical methods were used to detect GABARAP and β -III-tubulin. The exposure of hypoxia was carried out on the 2nd day after birth, in a special chamber with an oxygen content in the respiratory mixture of 7.8%. The study of the neocortex was

carried out on days 5 and 10. It was shown that animals in control, by the end of the neonatal period (P10), the content of GABARAP (according to the staining density of the immune reaction product) significantly increased: in the upper layers II-III by 2, and in the deep layers IV-VI by 4 times compared with the earlier period development (P5). The content of β -III-tubulin in the layers of the cortex is distributed evenly. Animals that survived exposure to hypoxia in the neonatal period showed a significant increase in the content of GABARAP and β -III-tubulin in the upper layers of the neocortex. These changes occur against the background of a significant decrease in the content of the GABA_A-receptor subtype (data obtained earlier). GABARAP and β -III-tubulin, as well as the GABA_A-receptor, are part of a complex of elements mediating GABA transmission in the neocortex. Hypoxia causes a change in the content of these proteins in the cerebral cortex, which can lead to disruption of the inhibitory effects of GABA.

Keywords: GABARAP, β -III-tubulin, neocortex, neonatal period, hypoxia

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОСОБЕННОСТИ УГАШЕНИЯ ПАМЯТИ О СТРАХЕ У САМЦОВ
И САМОК МЫШЕЙ *Disc1-Q31L*

© 2023 г. Н. Д. Чиждова^{1, 2, *}, К. В. Смирнова^{1, 3, **}, Н. И. Дубровина¹,
А. В. Калужев^{1, 3, 4, 5, 6}, Т. Г. Амтиславская^{1, 3}

¹Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

⁴Научно-технологический университет “Сириус”, Сочи, Россия

⁵Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁶Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

*E-mail: chnadezhda1995@gmail.com

**E-mail: vedelina@mail.ru

Поступила в редакцию 03.07.2023 г.

После доработки 14.10.2023 г.

Принята к публикации 23.10.2023 г.

Депрессивные расстройства являются наиболее распространенными психопатологиями, которые зачастую могут сосуществовать с другими психическими заболеваниями, например, с посттравматическим стрессовым расстройством. Известно и наличие гендерных различий в восприимчивости к этим психопатологиям. Мыши мутантной линии *Disc1-Q31L* характеризуются депрессивноподобным поведением и нарушением молекулярных путей, вовлеченных в связанные с памятью о страхе процессы. В работе исследованы половые и межлинейные различия процессов обучения и угашения условной реакции пассивного избегания у самцов и самок мышей линии *Disc1-Q31L* и контрольных мышей C57BL/6. Показано, что самцы и самки мышей обеих линий одинаково хорошо обучались, но различались по угашению памяти о страхе — способности формировать новый след памяти о безопасности в ранее опасном отсеке установки. Обнаружен дефицит угашения условной реакции пассивного избегания у самок C57BL/6 по сравнению с самцами, а также выявлены межлинейные различия в динамике угашения как у самок, так и у самцов. Самцы *Disc1-Q31L* достигали полного угашения позже, чем самцы C57BL/6, а у самок *Disc1-Q31L* не обнаружено угашения в течение всех 24 дней теста. Таким образом, в данной работе показано не только вовлечение гена *Disc1* в процессы угашения памяти о страхе, но и дифференцированное влияние мутации Q31L в гене *Disc1* на процессы ее угашения в зависимости от пола мыши.

Ключевые слова: угашение, страх, условная реакция пассивного избегания, половые различия, депрессия, мыши линий *Disc1-Q31L* и C57BL/6

DOI: 10.31857/S0869813923120038, EDN: EWSIJJ

ВВЕДЕНИЕ

Большое депрессивное расстройство (БДР) — длительное психическое заболевание, влияющее на мышление, настроение и физическое здоровье, а также являю-

щееся частой причиной инвалидности и суицида [1, 2]. Согласно исследованию “Global Burden of Disease” 2019 г., среди психопатологий лидируют тревожные и депрессивные расстройства [3]. Этиология и патогенез депрессии еще недостаточно изучены, поэтому при исследовании патофизиологических механизмов депрессии и при поиске новых терапевтических подходов широко используют модели на животных [4–7]. С другой стороны, депрессия включает схожие с другими психопатологиями механизмы, например, с посттравматическим стрессовым расстройством (ПТСР) [8].

Среди множества экспериментальных моделей депрессии представляет интерес генетическая модель с точечной мутацией гена *Disc1* (Disrupted-In-Schizophrenia-1), обладающая разнообразием проявляемых нарушений, подробно описанных в ряде обзоров [9, 10]. Мыши линии *Disc1*-Q31L несут точечную мутацию во 2-м экзоне гена *Disc1*, приводящую к замене глицина на лейцин в положении 31-й аминокислоты в белке DISC1 [11]. Для мутантной линии мышей *Disc1*-Q31L установлены такие особенности поведения, как выраженное поведенческое отчаяние, пониженное предпочтение сахарозы и дефицит социального поведения, что корректировалось антидепрессантами, но не антипсихотиками [11]. Показано, что мутация *Disc1*-Q31L приводит к нарушению взаимодействия белка DISC1 и фосфодиэстеразы PDE4B, которая принимает участие в процессах, связанных с памятью о страхе, а нарушения ее активности наблюдаются при биполярном расстройстве и депрессии [10]. Таким образом, пересечение путей регуляции депрессивноподобного поведения с механизмами регуляции памяти делает мышей *Disc1*-Q31L потенциальной моделью для исследований ПТСР-подобных состояний.

Угашение реакции условно-рефлекторного страха заключается в формировании новой условной реакции, которая взаимодействует с ранее выработанным рефлексом. Этот процесс является одним из центральных при организации адаптивного поведения и в первую очередь подвержен изменениям при психопатологиях, в том числе и при ПТСР-подобных состояниях [12, 13].

В последние годы исследователи стали уделять большее внимание половым различиям при изучении различных психопатологий, а для депрессии показано, что женщины гораздо чаще мужчин имеют такой диагноз [3]. Подобные половые различия обнаружены на животных моделях, в том числе в процессах угашения памяти страха [14, 15]. Таким образом, изучение половых различий в реакции угашения условно-рефлекторного страха у мышей *Disc1*-Q31L является актуальной задачей.

В связи с вышеизложенным цель настоящей работы заключалась в изучении половых и линейных особенностей угашения условной реакции пассивного избегания у мышей *Disc1*-Q31L по сравнению с мышами C57BL/6.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на 48 мышах дикого типа (генетический фон – инбредная линия C57BL/6; контрольная линия, WT) и линии *Disc1*-Q31L. Были составлены 4 группы: 1-я группа – самцы мышей WT в возрасте 3–4 мес. ($n = 12$), 2-я – самки WT, 3–4 мес. ($n = 12$), 3-я – самцы *Disc1*-Q31L, 3–4 мес. ($n = 12$), 4-я – самки *Disc1*-Q31L, 3–4 мес. ($n = 12$). Мыши линии *Disc1*-Q31L получены из УНУ “Биологическая коллекция – генетические биомодели нейropsychических заболеваний” (№ 493387) НИИ нейронаук и медицины [16]. Животных содержали по 4 особи в клетке при свободном доступе к пище и воде.

Выработку условной реакции пассивного избегания на контекст осуществляли по общепринятой методике однократного обучения в экспериментальной камере с темным и светлым отсеками в автоматизированной установке “Gemini Avoidance System” (San-Diego Instruments, США) [17]. Перед обучением животные знакоми-

лись с обстановкой в тестовой камере в течение трех минут, после чего их возвращали в домашнюю клетку. На следующий день начинали обучение с применением тока силой 0.75 мА в течение 2 с.

Угашение представляет собой экспериментальную процедуру, которая включает повторное многократное предъявление условного стимула (контекст экспериментальной установки) без предъявления аверсивного стимула. В сессии угашения мышь сразу после перехода в темный отсек переносили в домашнюю клетку. С помощью программного обеспечения Gemini автоматически регистрировался латентный период перехода в темное отделение. Латентный период перехода в день обучения отражал исходное время, характерное для реакции перехода в предпочитаемый отсек темной камеры, при тестировании через 24 ч являлся показателем выработки условной реакции пассивного избегания, а при последующих 24 тестированиях — угашения этой реакции.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических Т-критерия Вилкоксона и критерия Фридмана для связанных выборок, поскольку распределение данных не соответствовало нормальному (критерий Шапиро—Уилка, $p < 0.05$) в программе STATISTICA 10, с последующим попарным анализом с помощью критерия Дарбина—Коновера программы Jamovi (версия 2.2.5).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обучение условной реакции пассивного избегания проявлялось в увеличении латентного периода перехода в темную камеру при тестировании через 24 ч по сравнению с днем выработки рефлекса (рис. 1). Анализ данного показателя за эти два дня при помощи Т-критерия Вилкоксона выявил эффект повторных измерений для самцов, самок WT, самцов и самок мышей *Disc1-Q31L* (W , $p < 0.001$). Результаты свидетельствуют о том, что мыши линий *Disc1-Q31L* и WT хорошо обучились пассивному избеганию, так как не было достоверных различий в средних значениях латентного периода перехода между группами мышей.

На рис. 2 представлена динамика развития угашения выработанного рефлекса по мере многократного тестирования в экспериментальной установке у мышей WT и *Disc1-Q31L*. Отчетливо видны половые различия в угашении условной реакции пассивного избегания у этих мышей. При анализе показателей латентного периода перехода в течение 24 дней тестирования критерием Фридмана было показано влияние повторных измерений для самцов и самок WT ($\chi^2 = 172.50$; $df = 23$; $p < 0.001$ и $\chi^2 = 101.57$; $df = 23$; $p < 0.001$ соответственно) и самцов *Disc1-Q31L* ($\chi^2 = 75.9$; $df = 23$; $p < 0.001$), но не для самок *Disc1-Q31L* ($\chi^2 = 22.6$; $df = 23$; $p = 0.482$).

Последующие попарные сравнения позволили детальнее оценить зависимость половых различий в угашении от генотипа мышей. Для самок мышей обеих линий характерна задержка угашения. Так, у самок WT снижение значений латентного периода перехода относительно уровня обучения (1-й тест после обучения) происходило во время 10-го тестирования ($p < 0.001$), а у самцов начиналось с 8-го теста ($p < 0.001$). У самцов *Disc1-Q31L* угашение начиналось с 18-го теста ($p < 0.01$). У самок *Disc1-Q31L* не обнаружено значимого угашения в течение всех 24 дней тестирования.

Оценка времени достижения полного угашения, когда значения латентного периода перехода при тестировании не отличались от показателей в день выработки рефлекса, также является показателем межлинейных различий процесса угашения (рис. 2). Показано, что у самцов WT полное угашение наступило во время 10-го тестирования, а у самцов *Disc1-Q31L* — во время 19-го, что отражает задержку угашения у последних. У самок WT полное угашение произошло на 17-й день теста, а у самок *Disc1-Q31L* даже после 24 “напоминаний” контекста экспериментальной

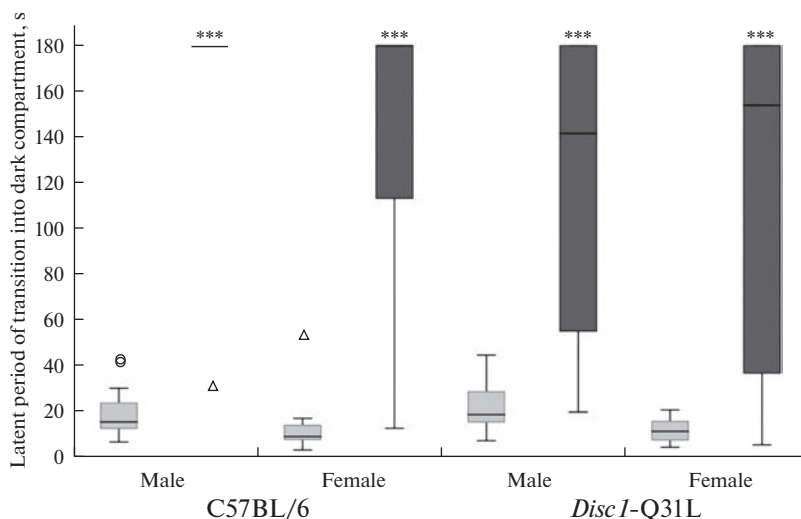


Рис. 1. Выработка условной реакции пассивного избегания у самцов и самок мышей линий *Disc1-Q31L* и C57BL/6. Светлые прямоугольники — латентный период перехода в темный отсек в день обучения, темные — латентный период перехода в темный отсек при тестировании через 24 ч после обучения. Показаны медиана, межквартильный размах (прямоугольники) — от первого до третьего квартиля, максимальное и минимальное значение данных в пределах $1.5 \times \text{IQR}$ (усы); точки данных за пределами прямоугольников — выбросы (○) и экстремумы (△). *** — $p < 0.001$ по сравнению с днем обучения.

Примечание: 11 из 12 самцов C57BL/6 показали максимальное время латентного периода перехода, и только 1 перешел на 30.8-й с, из-за чего данный метод анализа рассматривает эту точку как экстремум, не учитывая ее в расчетах медианы, межквартильного размаха и усов, поэтому на графике все эти данные находятся в одной точке (180 с).

установки значения латентного периода перехода достоверно отличались от данных в день выработки рефлекса ($p < 0.05$), но были несколько ниже, чем в начале процедуры угашения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Способность выявлять угрозы в окружающем мире и целенаправленно реагировать на них имеет решающее значение для адаптации организма. Эта адаптивная функция связана с возможностью быстрого и постоянного приобретения ассоциаций между нейтральными стимулами, включая контекст, и негативным событием. Нарушения данного показателя встречаются при многих психопатологиях, включая ПТСР [12, 13]. Мутация *Disc1-Q31L* приводила к нарушению динамики процесса угашения как у самцов, так и у самок, вплоть до полного его отсутствия за период тестирования у последних.

Как говорилось ранее, женщины более склонны к развитию депрессии, тревожного расстройства и, по некоторым данным, ПТСР [18, 19]. Поэтому задержка угашения у самок WT и отсутствие угашения у самок *Disc1-Q31L* свидетельствуют в поддержку этой гипотезы и согласуются с более ранними работами на модельных животных [14, 15]. Показано также, что у самок существенно снижена способность дифференцировать сигналы, свидетельствующие об опасности или безопасности контекста, что может вызывать наблюдаемые межполовые различия в угашении [20].

Кроме того, у мышей *Disc1*-Q31L задержка угашения может быть признаком наличия расстройства, подобного ПТСР. Свидетельством тому служат данные, указывающие на роль белка DISC1 в регуляции фосфодиэстеразы PDE4B, которая принимает участие в процессах, связанных с памятью о страхе [10, 21]. Биохимический анализ показал, что мутация *Disc1*-Q31L приводит к снижению активности PDE4B, что может оказывать влияние на увеличение периода угашения памяти о страхе у самцов и отсутствие его у самок [11].

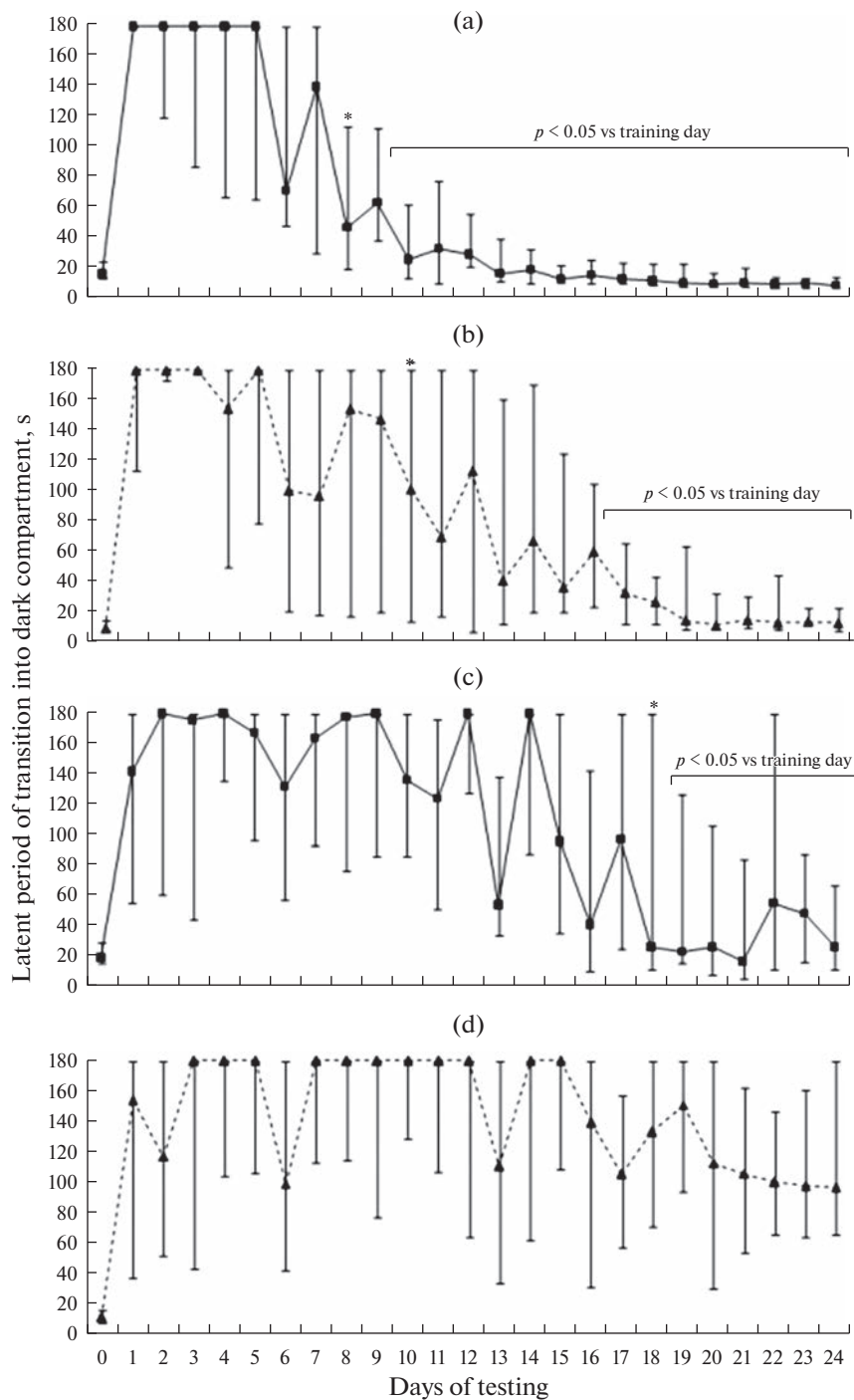
Более того, по литературным данным, мутация *Disc1*-Q31L вызывает истощение основных нейротрансмиттеров (дофамина, серотонина и норадреналина), что хорошо согласуется с моноаминергической теорией депрессии [22]. В то же время есть данные о том, что при посттравматическом стрессовом расстройстве у людей наблюдается дефицит гедонистической способности или способности к вознаграждению. Такие нарушения, как предполагают, связаны с нарушением дофаминергической нейротрансмиссии. В поддержку этой гипотезы выступает то, что посттравматическое стрессовое расстройство, связанное с боевыми действиями, чувствительно к лечению психостимуляторами, которые усиливают дофаминергический сигналинг [22]. Так, можно предположить, что у мышей с мутацией *Disc1*-Q31L происходит пересечение путей, вызывающих депрессивноподобное поведение и процессы памяти о страхе.

Обращает на себя внимание тот факт, что у самцов мышей с другой точечной мутацией в том же втором экзоне гена *Disc1* (*Disc1*-L100P), характеризующихся шизофреноподобным фенотипом, показано более раннее угашение памяти о страхе [23], тогда как для мышей с мутацией *Disc1*-Q31L выявленное в работе более позднее угашение условнорефлекторного избегания в большей степени связано с депрессивноподобным фенотипом, признаками ПТСР-подобного состояния и предрасположенностью к развитию эмоционально-стрессовых расстройств.

В недавнем исследовании показано, что поведенческие особенности мышей *Disc1*-Q31L могут быть связаны с повышенной плотностью нейронов в латеральной и медиальной хабенуле [7]. В данной работе также отмечалась задержка угашения памяти о страхе у гомозиготных *Disc1*-Q31L мышей, но имелись некоторые отличия. Так, мутантные мыши к концу эксперимента (20-й день тестирования) не достигали полного угашения, при этом латентное время перехода у самок отличалось от WT, достигших этого показателя, в меньшей степени, чем у самцов. Тогда как в нашей работе показано полное угашение условнорефлекторного избегания у самцов *Disc1*-Q31L на 19-й день тестирования и отсутствие даже начала угашения у самок. Эти различия объясняются иными условиями проведения эксперимента, в частности, применением в нашей работе большей силы тока в день обучения. Следует отметить, что дикий тип показывал очень близкие результаты по дням угашения, не отличаясь из-за разницы в условиях, из чего можно заключить, что мыши линии *Disc1*-Q31L и C57BL/6 обладают разными уровнями чувствительности к стрессогенным стимулам.

Хабенула играет важную роль в модификации моноаминовой передачи сигналов, поведенческих реакций на стресс и вовлечена в патогенез психопатологий. Снижение ее объема и повышение активности связано с этиологией депрессии, в

Рис. 2. Половые и межлинейные различия угашения условной реакции пассивного избегания у мышей линий *Disc1*-Q31L и C57BL/6: (a) — самцы C57BL/6; (b) — самки C57BL/6; (c) — самцы *Disc1*-Q31L; (d) — самки *Disc1*-Q31L. Показаны медиана и межквартильный размах (усы). * — $p < 0.05$ по сравнению с первым днем тестирования (показано только начало угашения — то есть первый такой день); также показаны дни полного угашения условной реакции пассивного избегания ($p > 0.05$ по сравнению с днем обучения).



особенности у женщин, а также у пациентов с биполярным расстройством [24]. В то же время у пациентов с ПТСР не было показано морфологических изменений хабенулы [25]. С другой стороны, однократное воздействие острых стрессоров, таких как неизбежный электрошок крыс, значительно увеличивает величину долговременной потенциации в латеральной хабенуле [26]. Таким образом, в патогенезе ПТСР могут принимать участие физиологические, а не морфологические изменения в хабенуле.

В экспрессию условнорефлекторного страха вовлечены и другие мозговые структуры — у самок преимущественно базолатеральная миндалина, у самцов гиппокамп, а в его торможение — медиальная префронтальная кора, функционирование которой имеет половые различия, приводящие к более слабому подавлению реакции страха у самок [27, 28]. Поскольку ген *Disc 1* играет большую роль в нейро-развитии, то аномалии развития мозга могут вызывать спектр поведенческих нарушений, в том числе в угашении условнорефлекторной реакции страха [10, 29]. На сегодняшний день показано снижение объема мозга и количества корковых нейронов у мышей *Disc 1*-Q31L, однако этих данных недостаточно для однозначной интерпретации [11, 29].

Таким образом, в данной работе показано вовлечение мутации Q31L в гене *Disc 1* в процессы реконсолидации памяти, которые пересекаются с процессами, вовлеченными в патогенез ПТСР и депрессии.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Опыты проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. и “Правилами лабораторной практики”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (№ 708н г. от 23.08.2010).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (тема № 122042700001-9).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.И.Д. — планирование эксперимента, сбор данных, Н.Д.Ч., К.В.С. — обработка данных, написание статьи, А.В.К., Т.Г.А. — обсуждение результатов и редактирование статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malhi GS, Mann JJ (2018) Depression. Lancet 392: 2299–2312. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31948-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31948-2)
2. Pu S, Setoyama S, Noda T (2017) Association between cognitive deficits and suicidal ideation in patients with major depressive disorder. Sci Rep 7: 11637. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12142-8>
3. Castelpietra G, Knudsen AKS, Agardh EE, Armocida B, Beghi M, Iburg KM, Logroscino G, Ma R, Starace F, Steel N, Addolorato G, Andrei CL, Andrei T, Ayuso-Mateos JL, Banach M, Bärnighausen TW, Barone-Adesi F, Bhagavathula AS, Carvalho F, Carvalho M, Chandan JS, Chattu VK, Couto RAS, Cruz-Martins N, Dargan PI, Deuba K, da Silva DD, Fagbamigbe AF, Fernandes E, Ferrara P, Fischer F, Gaal PA, Gialluisi A, Haagsma JA, Haro JM, Hasan MT, Hasan SS, Hostiuc S, Iacoviello L, Iavicoli I, Jamshidi E, Jonas JB, Joo T, Jozwiak JJ, Katikireddi SV, Kauppila JH, Khan MAB, Kisa A, Kisa S, Kivimäki M, Koly KN, Koyanagi A, Kumar M, Lallukka T, Langguth B, Led-

- da C, Lee PH, Lega I, Linehan C, Loureiro JA, Madureira-Carvalho ÁM, Martinez-Raga J, Mathur MR, McGrath JJ, Mechili EA, Mentis A-FA, Mestrovic T, Miazgowski B, Mirica A, Mirijello A, Moazen B, Mohammed S, Mulita F, Nagel G, Negoi I, Negoi RI, Nwatah VE, Padron-Monedero A, Panda-Jonas S, Pardhan S, Pasovic M, Patel J, Petcu I-R, Pinheiro M, Pollok RCG, Postma MJ, Rawaf DL, Rawaf S, Romero-Rodríguez E, Ronfani L, Sagoe D, Sanmarchi F, Schaub MP, Sharew NT, Shiri R, Shokraneh F, Sigfusdottir ID, Silva JP, Silva R, Socea B, Szócska M, Tabarés-Seisdedos R, Torrado M, Tovani-Palone MR, Vasankari TJ, Veroux M, Viner RM, Werdecker A, Winkler AS, Hay SI, Ferrari AJ, Naghavi M, Allebeck P, Monasta L (2022) The burden of mental disorders, substance use disorders and self-harm among young people in Europe, 1990–2019: Findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Reg Heal – Eur* 16: 100341.
<https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2022.100341>
4. Willner P (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 83: 1–16.
<https://doi.org/10.1007/BF00427414>
 5. Becker M, Pinhasov A, Ornoy A (2021) Animal Models of Depression: What Can They Teach Us about the Human Disease? *Diagnostics* 11: 123.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics11010123>
 6. Song J, Kim Y (2021) Animal models for the study of depressive disorder. *CNS Neurosci Ther* 27: 633–642.
<https://doi.org/10.1111/cns.13622>
 7. Serykh A, Khrapova MV, Dubrovina NI, Petrova ES, Mikhnevich N, Starostina MV, Amstislavskaya TG, Lipina TV (2020) The increased density of the habenular neurons, high impulsivity, aggression and resistant fear memory in Disc1-Q31L genetic mouse model of depression. *Behav Brain Res* 392: 112693.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112693>
 8. Roley ME, Claycomb MA, Contractor AA, Dranger P, Armour C, Elhai JD (2015) The relationship between rumination, PTSD, and depression symptoms. *J Affect Disord* 180: 116–121.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.04.006>
 9. Tomoda T, Sumitomo A, Jaaro-Peled H, Sawa A (2016) Utility and validity of DISC1 mouse models in biological psychiatry. *Neuroscience* 321: 99–107.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.061>
 10. Lipina TV, Roder JC (2014) Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1) interactome and mental disorders: Impact of mouse models. *Neurosci Biobehav Rev* 45: 271–294.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.07.001>
 11. Clapcote SJ, Lipina TV, Millar JK, Mackie S, Christie S, Ogawa F, Lerch JP, Trimble K, Uchiyama M, Sakuraba Y, Kaneda H, Shiroishi T, Houslay MD, Henkelman RM, Sled JG, Gondo Y, Porteous DJ, Roder JCC (2007) Behavioral Phenotypes of Disc1 Missense Mutations in Mice. *Neuron* 54: 387–402.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.015>
 12. Bouton ME, Maren S, McNally GP (2021) Behavioral and neurobiological mechanisms of pavlovian and instrumental extinction learning. *Physiol Rev* 101: 611–681.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2020>
 13. Bentefour Y, Bennis M, Garcia R, M'hamed SB (2015) Effects of paroxetine on PTSD-like symptoms in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 232: 2303–2312.
<https://doi.org/10.1007/s00213-014-3861-2>
 14. Colom-Lapetina J, Li AJ, Pelegrina-Perez TC, Shansky RM (2019) Behavioral Diversity Across Classic Rodent Models Is Sex-Dependent. *Front Behav Neurosci* 13: 45.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00045>
 15. Velasco ER, Florido A, Milad MR, Andero R (2019) Sex differences in fear extinction. *Neurosci Biobehav Rev* 103: 81–108.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.05.020>
 16. Petrova E, Gromova A, Anisimenko M, Ruban L, Egorova S, Petrovskaya I, Amstislavskaya T, Lipina T (2018) Maintenance of Genetically Modified Mouse Lines: Input to the Development of Bio-Collections In Russia. *Lab Anim Sci Res* 1.
<https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-02-01>
 17. Dubrovina NI, Khrapova MV, Lipina TV (2018) Characteristics of the Formation of Memories Relating to Fear in Mice with Depression- and Schizophrenia-Like Phenotypes: Effects of Gender and Age. *Neurosci Behav Physiol* 48: 488–495.
<https://doi.org/10.1007/s11055-018-0590-8>
 18. Gobinath AR, Mahmoud R, Galea LAM (2015) Influence of sex and stress exposure across the lifespan on endophenotypes of depression: focus on behavior, glucocorticoids, and hippocampus. *Front Neurosci* 8.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00420>
 19. Bangasser DA, Valentino RJ (2014) Sex differences in stress-related psychiatric disorders: Neurobiological perspectives. *Front Neuroendocrinol* 35: 303–319.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.03.008>

20. Greiner EM, Müller J, Norris MR, Ng KH, Sangha S (2019) Sex differences in fear regulation and reward-seeking behaviors in a fear-safety-reward discrimination task. *Behav Brain Res* 368: 111903.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111903>
21. McGirr A, Lipina TV, Mun H-S, Georgiou J, Al-Amri AH, Ng E, Zhai D, Elliott C, Cameron RT, Mullins JG, Liu F, Baillie GS, Clapcote SJ, Roder JC (2016) Specific Inhibition of Phosphodiesterase-4B Results in Anxiolysis and Facilitates Memory Acquisition. *Neuropsychopharmacology* 41: 1080–1092.
<https://doi.org/10.1038/npp.2015.240>
22. Lipina TV, Fletcher PJ, Lee FH, Wong AH, Roder JC (2013) Disrupted-In-Schizophrenia-1 Gln31Leu Polymorphism Results in Social Anhedonia Associated with Monoaminergic Imbalance and Reduction of CREB and β -arrestin-1,2 in the Nucleus Accumbens in a Mouse Model of Depression. *Neuropsychopharmacology* 38: 423–436.
<https://doi.org/10.1038/npp.2012.197>
23. Чижова НД, Смирнова КВ, Дубровина НИ, Липина ТВ (2023) Половые и линейные различия у мышей DISC1-L100P и C57BL/6 в угашении условной реакции пассивного избегания. *Журн высш нервн деятелн им ИП Павлова* 73: 425–432. [Chizhova ND, Smirnova KV, Dubrovina NI, Lipina TV (2023) Sex and linear differences in DISC1-L100P and C57BL/6 mice in the extinction of the conditioned passive avoidance response. *J Higher Nerve Activity IP Pavlova* 73: 425–432. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S004446772303005X>
24. Savitz JB, Nugent AC, Bogers W, Roiser JP, Bain EE, Neumeister A, Zarate CA, Manji HK, Cannon DM, Marrett S, Henn F, Charney DS, Drevets WC (2011) Habenula Volume in Bipolar Disorder and Major Depressive Disorder: A High-Resolution Magnetic Resonance Imaging Study. *Biol Psychiatry* 69: 336–343.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.09.027>
25. Savitz JB, Bonne O, Nugent AC, Vythilingam M, Bogers W, Charney DS, Drevets WC (2011) Habenula volume in post-traumatic stress disorder measured with high-resolution MRI. *Biol Mood Anxiety Disord* 1: 7.
<https://doi.org/10.1186/2045-5380-1-7>
26. Park H, Rhee J, Park K, Han J-S, Malinow R, Chung C (2017) Exposure to Stressors Facilitates Long-Term Synaptic Potentiation in the Lateral Habenula. *J Neurosci* 37: 6021–6030.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2281-16.2017>
27. Day HLL, Stevenson CW (2020) The neurobiological basis of sex differences in learned fear and its inhibition. *Eur J Neurosci* 52: 2466–2486.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14602>
28. Marek R, Xu L, Sullivan RKP, Sah P (2018) Excitatory connections between the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex show a role for the prelimbic cortex in fear extinction. *Nat Neurosci* 21: 654–658.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0137-x>
29. Lee FHF, Fadel MP, Preston-Maher K, Cordes SP, Clapcote SJ, Price DJ, Roder JC, Wong AHC (2011) Disc1 Point Mutations in Mice Affect Development of the Cerebral Cortex. *J Neurosci* 31: 3197–3206.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4219-10.2011>

Peculiarities of Fear Memory Disturbance in Male and Female *Disc1*-Q31L Mice

N. D. Chizhova^{a, b, *}, K. V. Smirnova^{a, b, **}, N. I. Dubrovina^a,
A. V. Kalueff^{a, c, d, e, f}, and T. G. Amstislavskaya^{a, c}

^aScientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

^bInstitute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia

^cNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

^dSirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

^eSt. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

^fUral Federal University, Yekaterinburg, Russia

*e-mail: chnadezhda1995@gmail.com

**e-mail: vedelina@mail.ru

Depressive disorder is the most common psychopathology that can coexist with other mental illnesses such as post-traumatic stress disorder. It has been shown that there are gender differences in susceptibility to these psychopathologies. Mice of the mutant strain *Disc1*-Q31L are characterized by depressive-like behavior and disruption of the

molecular pathways involved in the processes associated with fear memory. Gender and interstrain differences in the processes of learning and extinction of the conditioned response of passive avoidance were studied in male and female *Disc I*-Q31L mice and control C57BL/6 mice. It was shown that male and female mice of both strains learned equally well the conditioned response of passive avoidance, but differed in fear memory extinction, the ability to form a new safety memory trace in the previously dangerous dark compartment of the setup. However, there was a deficit in the extinction of the conditioned response of passive avoidance in C57BL/6 females compared to males, as well as interstrain differences in the dynamics of extinction in both females and males. *Disc I*-Q31L males reached full extinction later than C57BL/6 males, while *Disc I*-Q31L females did not exhibit extinction during the 24 days of the test. Thus, this work shows the interaction of the effect of gender and the *Disc I*-Q31L mutation on the processes of fear memory extinction.

Keywords: extinction, fear, passive avoidance, sex differences, depression, *Disc I*-Q31L mice, C57BL/6 mice

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**БАКЛОФЕН И ПРОИЗВОДНОЕ 4-ФЕНИЛПИРРОЛИДОНА ГИЖ-290
ОСЛАБЛЯЮТ КОМПУЛЬСИВНОПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ**

© 2023 г. Н. В. Кудряшов^{1, *}, А. В. Волкова¹, Я. С. Козин¹, А. А. Шимширт¹,
П. Л. Наплёкова¹, А. О. Королёв¹, Т. А. Воронина¹

¹НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, Москва, Россия

*E-mail: kunvi@mail.ru

Поступила в редакцию 05.09.2023 г.

После доработки 24.10.2023 г.

Принята к публикации 31.10.2023 г.

Обсессивно-компульсивное расстройство (ОКР) — психическое заболевание, характеризующееся obsессиями, которые вызывают выраженный дистресс и тревогу, и/или компульсиями, направленными на нейтрализацию дистресса и тревоги. Результаты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о возможной роли ГАМК_B-рецепторов в патогенезе ОКР, что делает актуальным изучение влияния лигандов этих рецепторов на компульсивноподобное поведение грызунов. Цель работы — изучение эффектов ГИЖ-290 и баклофена на экспериментальных моделях ОКР. Изучены эффекты ГИЖ-290 (0.01, 0.1, 1 мг/кг, в/б) и баклофена (0.1, 1 и 5 мг/кг, в/б) в тестах “Вращающийся стержень” и “Закапывание шариков”, а также на модели нарушения спонтанного чередования у мышей, вызванного введением 8-ОН-DPAT. Показано, что баклофен и ГИЖ-290 во всех исследуемых дозах ослабляли компульсивноподобное поведение мышей — уменьшали количество зарытых шариков в тесте “Закапывание шариков”, однако этот эффект баклофена в дозе 5 мг/кг сопровождался нарушением двигательной координации животных в тесте “Вращающийся стержень”. В то же время ни баклофен, ни ГИЖ-290 не ослабляли нарушение спонтанного чередования у мышей, вызванное введением 8-ОН-DPAT (2 мг/кг, в/б), напротив, баклофен в дозе 1 мг/кг усиливал это нарушение. Таким образом, баклофен и ГИЖ-290 обладают антикомпульсивной активностью в тесте “Закапывание шариков”, но не на модели нарушения спонтанного чередования у мышей, вызванного введением 8-ОН-DPAT.

Ключевые слова: обсессивно-компульсивное расстройство, ГАМК_B-рецептор, баклофен, мышь, 8-ОН-DPAT, ГИЖ-290, закапывание шариков

DOI: 10.31857/S0869813923120051, **EDN:** CGVDYU

ВВЕДЕНИЕ

Обсессивно-компульсивное расстройство (ОКР) — психическое заболевание, характеризующееся obsессиями, которые вызывают выраженный дистресс и тревогу, и/или компульсиями, направленными на нейтрализацию дистресса и тревоги [1]. ОКР является одним из наиболее распространенных психических расстройств и вносит существенный вклад в глобальное бремя болезней. Традиционно в патогенезе ОКР основную роль отводят изменениям в серотонинергической, дофаминергической и глутаматергической системах кортико-стриато-таламо-кортикальных нейронных цепей головного мозга [1, 2]. Результаты клинических исследований сви-

детельствуют также об изменениях в ГАМКергической системе — уменьшении уровня ГАМК в различных областях коры головного мозга у пациентов с ОКР [3–6]. Тем не менее, классические аллостерические модуляторы ГАМК_A-рецепторов, в частности, производные бензодиазепина, неэффективны в терапии ОКР [2]. В то же время дефицит ГАМКергической нейрональной передачи у пациентов с ОКР может быть ассоциирован с ГАМК_B-рецепторами [5], а полиморфизм гена ГАМК_B-рецептора может обуславливать генетическую предрасположенность к ОКР [7], что позволяет рассматривать его в качестве потенциальной мишени для фармакологической коррекции этого заболевания.

Баклофен (5 и 10 мг/кг), агонист ГАМК_B-рецепторов, ослабляет компульсивно-подобное поведение мышей в тесте “Закапывание шариков”, однако этот эффект сопровождается уменьшением двигательной активности, что, по-видимому, обусловлено центральным миорелаксирующим действием этого вещества [8]. В то же время влияние баклофена в малых дозах на компульсивноподобное поведение грызунов изучено не было. Такой подход позволил бы разделить антикомпульсивный и миорелаксирующий эффекты баклофена, что представляется актуальной задачей.

Соединение ГИЖ-290 (2,6-диметиланилид (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты), синтезированное в ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”, производное 4-фенилпирролидона, обладает противосудорожным эффектом, который, по-видимому, обусловлен взаимодействием с ГАМК_B- [9] и метаботропными глутаматными рецепторами II группы (mGluR II) [10]. Блокаторы mGluR2/3 [11] наряду с модуляторами NMDA-рецепторов [12, 13] способны ослаблять компульсивноподобное поведение грызунов и могут рассматриваться в качестве потенциальной мишени для фармакологической коррекции ОКР. Активность ГИЖ-290 в отношении этих мишеней обуславливает актуальность изучения его эффектов на экспериментальных моделях ОКР.

Целью настоящего исследования являлось изучение эффектов ГИЖ-290 и баклофена на экспериментальных моделях ОКР.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Исследования проведены на 222 самцах ICR мышей массой 23–25 г (питомник “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественной суточной смене освещения день/ночь со свободным доступом к воде и корму, за исключением животных, у которых проводилась пищевая депривация продолжительностью 24 ч (4 раза в течение эксперимента). Эти животные получали доступ к корму в течение 1 ч в период пищевой депривации (4 раза в течение эксперимента).

Вещества

В работе были использованы: баклофен (0.1, 1 и 5 мг/кг, Sigma Aldrich), 2,6-диметиланилид (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты (0.01, 0.1 и 1 мг/кг, ГИЖ-290, “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”), флуоксетин (10 мг/кг, Sigma Aldrich), (±)-8-гидрокси-2-(дипропиламино) тетралина гидробромид (8-ОН-DPAT, 2 мг/кг, Sigma Aldrich). 8-ОН-DPAT растворяли в 0.9%-ном растворе натрия хлорида и вводили в/б за 15 мин до теста, все остальные вещества — в 0.9%-ном растворе натрия хлорида с добавлением Tween-80 (Sigma Aldrich) и вводили в/б за 30 мин до поведенческих тестов. В качестве контроля использовали эквивалентный объем (0.1 мл на 10 г массы тела животного) 0.9%-ного раствора натрия хлорида с добавлением Tween-80.

Выбор доз баклофена, флуоксетина и 8-ОН-DPAT был сделан в соответствии с данными об эффектах этих веществ на экспериментальных моделях ОКР [2, 8], а ГИЖ-290 — эмпирически из-за отсутствия данных о влиянии этого соединения на компульсивноподобное поведение и депрессивноподобное состояние грызунов.

Выбор флуоксетина в качестве препарата сравнения обусловлен общепринятыми подходами к доклиническому изучению различных веществ на экспериментальных моделях ОКР [2, 14] и данными о способности агонистов ГАМК_B-рецепторов модулировать серотонинергическую синаптическую передачу [15, 16].

Тест “Закапывание шариков”

В качестве экспериментальной установки использовали индивидуальные поликарбонатные боксы для грызунов (400 × 230 × 150 мм) с крышкой, дно боксов на 5 см заполняли плотно утрамбованным кукурузным подстилом. Предварительно животных помещали в боксы с подстилом на 30 мин с целью ознакомления. После предварительной посадки подстил утрамбовывали и помещали на него 20 стеклянных шариков диаметром 16 мм. Мышей помещали в боксы с шариками на 30 мин, по истечению которых подсчитывали количество зарытых шариков (зарытыми считались шарики, погруженные в подстил на 2/3) [17]. В экспериментальной комнате поддерживали минимальный уровень шума и освещение в 100 лк.

Тест “Вращающийся стержень”

Двигательную координацию мышей оценивали на установке рота-род для мышей (Ugo Basile, Италия), которая представляла собой вращающийся барабан диаметром 3 см, разделенный на 5 дорожек шириной 5.7 см. Начальная скорость вращения барабана составляла 4 оборота/мин, максимальная — 40 оборотов/мин, скорость вращения увеличивалась на 1 оборот каждые 8 с. Регистрировали время удерживания животного на барабане установки [18].

Нарушение спонтанного чередования, вызванное 8-ОН-DPAT

Экспериментальная установка представляла собой Y-лабиринт для мышей, оснащенный дверцами с ручным управлением [19]. В первый день животное на 10 мин помещали в лабиринт с возможностью свободно исследовать все рукава лабиринта (все дверцы были открыты). Во второй день, после 24-часовой пищевой депривации, животное помещали в стартовый рукав лабиринта; в одном целевом рукаве размещали несколько гранул корма, второй был закрыт дверцей. Животное в течение 5 мин имело возможность найти и съесть корм, затем процедуру повторяли с другим целевым рукавом, после чего животных возвращали в домашние клетки и в течение 1 ч предоставляли свободный доступ к корму. На третий день (тренировочные сеансы) животное, после пищевой депривации, помещали в стартовый рукав лабиринта и открывали доступ к двум целевым рукавам с кормом, предоставляя возможность выбрать любой из них. После успешного выбора (пересечения границы всеми четырьмя лапами) животное возвращали в стартовый рукав, который закрывали дверцей на 10 с, восполняли запас гранул в рукавах, после чего животное снова могло выбрать один из двух целевых рукавов. Данную процедуру повторяли 7 раз, фиксируя выбор целевых рукавов. На каждую попытку отводили не более 90 с. По окончании тренировочного сеанса животных возвращали в домашние клетки и в течение 1 ч предоставляли свободный доступ к корму. В общей сложности тренировочные сеансы повторяли в течение 2 дней, в ходе которых фиксировали количество повторных выборов. Животных, которые после третьего тренировочного сеанса совершали более 2 повторных выборов или не покидали

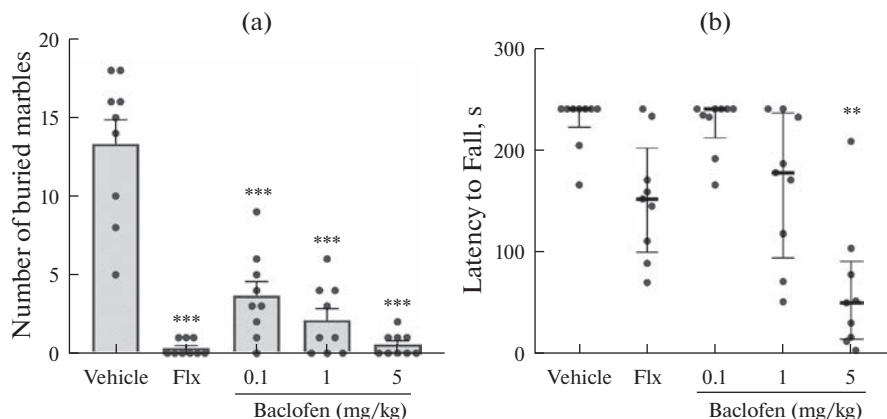


Рис. 1. Эффекты баклофена (0.1, 1, 5 мг/кг) и флуоксетина (10 мг/кг) в тестах “Закапывание шариков” (a) и “Вращающийся стержень” (b). Number of buried marbles – количество зарытых шариков, latency to fall – время удерживания, vehicle – растворитель (контрольная группа), Flx – флуоксетин в дозе 10 мг/кг, baclofen – баклофен, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ по сравнению с растворителем. Данные представлены как $M \pm SEM$ (a) и Me с межквартильным интервалом (b).

стартовый рукав в течение двух попыток, исключали из эксперимента. Перед тестовым сеансом животные подвергались 24-часовой пищевой депривации, затем процедуру, описанную для тренировочного сеанса, повторяли, однако за 15 мин до посадки в лабиринт животным в/б вводили 8-ОН-ДРАТ. В ходе тестовой процедуры также фиксировали количество повторных выборов. После каждого животного лабиринт очищали с помощью 70%-ного этилового спирта и бумажного полотенца.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc. США). Проверку результатов на нормальность распределения осуществляли с помощью обобщенного теста Д’Агостино-Пирсона, после чего данные были представлены в виде $M \pm SEM$, либо (Q1, Me, Q3) в случае, если распределение отклонялось от нормального. Отличия между группами определяли по методу однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки, либо по критерию Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением в тесте Данна. Результаты считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест “Закапывание шариков”

В эксперименте с баклофеном однофакторный дисперсионный анализ показал значимое влияние изучаемых веществ на компульсивноподобное поведение мышей ($F_{(4, 40)} = 37.98$; $p < 0.001$), а проведенный апостериорный тест Тьюки выявил различия между средними значениями количества зарытых шариков в группе флуоксетина (0.3 ± 0.2 , $n = 9$, $p < 0.001$), баклофена в дозах 0.1 мг/кг (3.7 ± 0.9 , $n = 9$, $p < 0.001$), 1 мг/кг (2.1 ± 0.7 , $n = 9$, $p < 0.001$) и 5 мг/кг (0.6 ± 0.2 , $n = 9$, $p < 0.001$) по сравнению с контрольной группой (13.3 ± 1.5 , $n = 9$) (рис. 1a).

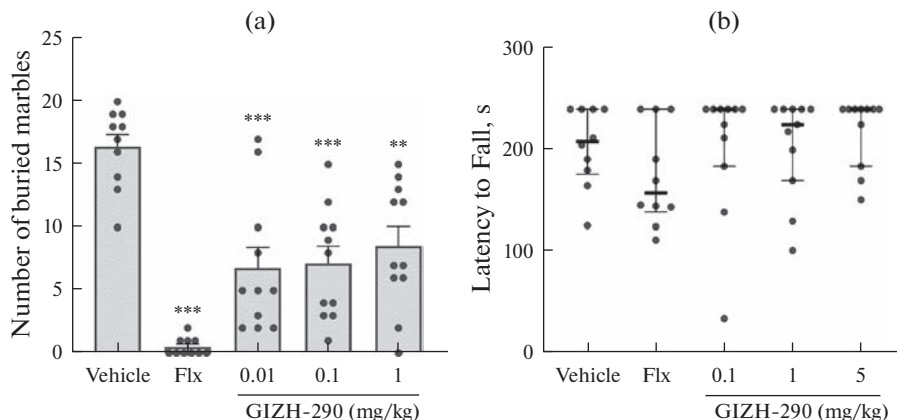


Рис. 2. Эффекты ГИЖ-290 (0.01, 0.1, 1 мг/кг) и флуоксетина (10 мг/кг) в тестах “Закапывание шариков” (а) и “Вращающийся стержень” (b). Number of buried marbles – количество зарытых шариков, latency to fall – время удерживания, vehicle – растворитель (контрольная группа), Flx – флуоксетин в дозе 10 мг/кг, GIZH-290 – ГИЖ-290, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ по сравнению с растворителем. Данные представлены как $M \pm SEM$ (а) и Me с межквартильным интервалом (b).

В эксперименте с ГИЖ-290 однофакторный дисперсионный анализ показал значимое влияние изучаемых веществ на компульсивноподобное поведение мышей ($F_{(4, 48)} = 18.59$; $p < 0.001$), а проведенный апостериорный тест Тьюки выявил различия между средними значениями количества зарытых шариков в группе флуоксетина (0.5 ± 0.2 , $n = 10$, $p < 0.001$), ГИЖ-290 в дозах 0.01 мг/кг (6.8 ± 1.6 , $n = 11$, $p < 0.001$), 0.1 мг/кг (7.2 ± 1.3 , $n = 11$, $p < 0.001$) и 1 мг/кг (8.5 ± 1.5 , $n = 11$, $p < 0.001$) по сравнению с животными контрольной группы (16.4 ± 1.0 , $n = 10$) (рис. 2а).

Таким образом, баклофен и ГИЖ-290 во всех исследуемых дозах ослабляли компульсивноподобное поведение мышей – уменьшали количество зарытых шариков.

Тест “Вращающийся стержень”

В эксперименте с баклофеном критерий Краскела–Уоллиса выявил значимое влияние изучаемых веществ на двигательную координацию мышей ($H(4) = 25.3$; $p < 0.001$), а последующее множественное сравнение в тесте Данна выявило различия между медианами времени удерживания животных на барабане установки в контрольной группе (222.2, 240.0, 240.0, $n = 9$) и в группе баклофена 5 мг/кг (13.0, 49.0, 90.0, $n = 9$, $p < 0.001$), что свидетельствует о нарушении двигательной координации мышей (рис. 1b).

В эксперименте с ГИЖ-290 тест Краскела–Уоллиса не выявил значимого влияния изучаемых веществ на двигательную координацию мышей ($H(4) = 4.77$; $p = 0.3117$) (рис. 2b).

Нарушение спонтанного чередования, вызванное 8-ОН-DPAT

В эксперименте с баклофеном однофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние изучаемых веществ на спонтанное чередование мышей в Y-лабиринте ($F_{(4, 44)} = 15.4$, $p < 0.001$), а проведенный апостериорный тест Тьюки выявил различия между средними значениями количества повторных выборов целевых рукавов в группах 8-ОН-DPAT (2.6 ± 0.3 , $n = 10$, $p < 0.01$), флуоксетин + 8-ОН-DPAT

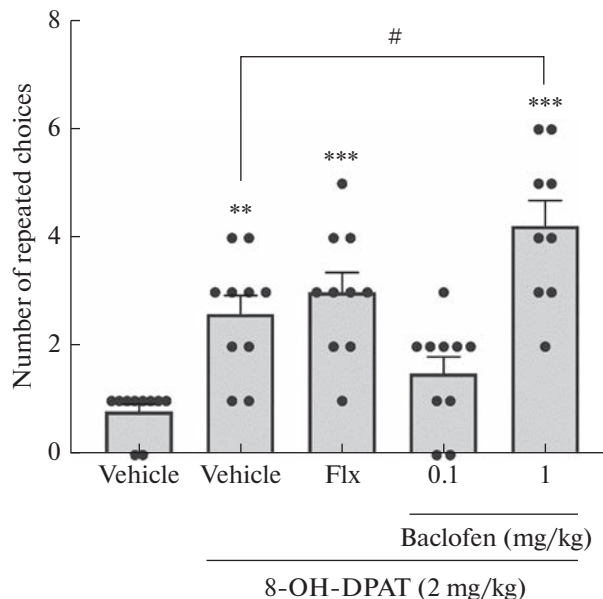


Рис. 3. Влияние 8-ОН-ДПАТ (2 мг/кг), флуоксетина (10 мг/кг) и баклофена (0.1, 1 мг/кг) на спонтанное чередование мышей в Y-лабиринте. Number of repeated choices – количество повторных выборов, vehicle – растворитель (контрольная группа), Flx – флуоксетин в дозе 10 мг/кг, baclofen – баклофен, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ по сравнению с растворителем, # – $p < 0.05$ по сравнению с группой растворитель + 8-ОН-ДПАТ. Данные представлены как $M \pm SEM$.

(3.0 ± 0.4 , $n = 10$, $p < 0.001$) и баклофен 1 мг/кг + 8-ОН-ДПАТ (4.2 ± 0.5 , $n = 9$, $p < 0.001$) по сравнению с животными контрольной группы (0.8 ± 0.1 , $n = 10$), а также между группами 8-ОН-ДПАТ (3.0 ± 0.4 , $n = 10$) и баклофен 1 мг/кг + 8-ОН-ДПАТ (4.2 ± 0.5 , $n = 9$, $p < 0.05$). Эффекты баклофена в дозе 5 мг/кг изучены не были по причине развития миорелаксации у мышей – животные не покидали стартовый рукав лабиринта (рис. 3).

В эксперименте с ГИЖ-290 однофакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние изучаемых веществ на спонтанное чередование мышей в Y-лабиринте ($F_{(5, 69)} = 7.75$, $p < 0.001$), а проведенный апостериорный тест Тьюки выявил различия между средними значениями количества повторных выборов целевых рукавов в группе 8-ОН-ДПАТ (3.1 ± 0.3 , $n = 13$, $p < 0.001$), в группе флуоксетин + 8-ОН-ДПАТ (3.6 ± 0.5 , $n = 12$, $p < 0.001$), ГИЖ-290 0.01 мг/кг + 8-ОН-ДПАТ (2.9 ± 0.6 , $n = 12$, $p < 0.01$), ГИЖ-290 0.1 мг/кг + 8-ОН-ДПАТ (2.7 ± 0.5 , $n = 12$, $p < 0.01$) и ГИЖ-290 1 мг/кг + 8-ОН-ДПАТ (3.8 ± 0.5 , $n = 12$, $p < 0.001$) по сравнению с животными контрольной группы (0.4 ± 0.2 , $n = 14$) (рис. 4).

Таким образом, баклофен не только не ослаблял нарушение спонтанного чередования у мышей, вызванного введением 8-ОН-ДПАТ, но и усиливал его в дозе 1 мг/кг. В то же время ГИЖ-290 не оказывал значимого влияния на нарушение спонтанного чередования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Баклофен, ГИЖ-290 и флуоксетин ослабляли компульсивноподобное поведение мышей в тесте “Закапывание шариков”, но не влияли на нарушение спонтанного чередования в Y-лабиринте, вызванное введением 8-ОН-ДПАТ.

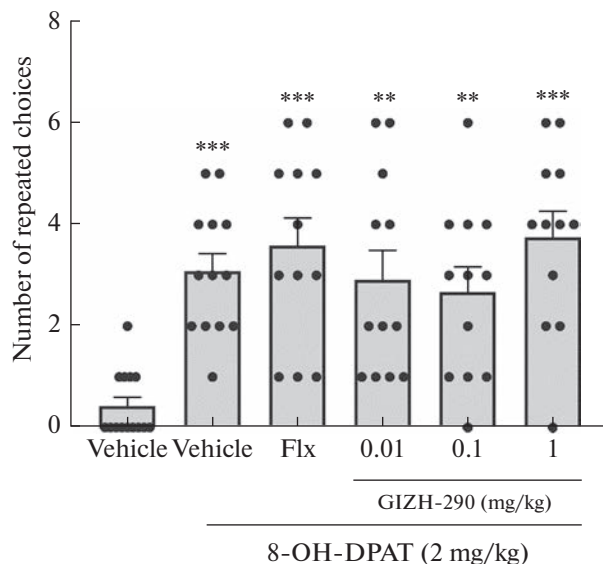


Рис. 4. Влияние 8-ОН-DPAT (2 мг/кг), флуоксетина (10 мг/кг) и ГИЖ-290 (0.01, 0.1, 1 мг/кг) на спонтанное чередование мышей в Y-лабиринте. Number of repeated choices — количество повторных выборов, vehicle — растворитель (контрольная группа), Flx — флуоксетин в дозе 10 мг/кг, GIZH-290 — ГИЖ-290, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$ по сравнению с растворителем. Данные представлены как $M \pm SEM$.

Ослабление компульсивноподобного поведения мышей в тесте “Закапывание шариков”, но не на методике “Нарушение спонтанного чередования, вызванное введением 8-ОН-DPAT” после однократного введения флуоксетина согласуется с данными литературы об особенностях действия селективных ингибиторов обратного захвата серотонина в этих тестах [2, 14].

Установлено, что баклофен в дозе 5 мг/кг также нарушал двигательную координацию мышей в тесте “Вращающийся стержень”, что, по-видимому, обусловлено центральным миорелаксирующим и седативным действием [20] и согласуется с его способностью уменьшать двигательную активность грызунов в зависимости от дозы [21]. Уменьшение количества зарытых шариков, наблюдаемое после применения баклофена в дозе 5 мг/кг в тесте “Закапывание шариков”, по-видимому, следует рассматривать не как ослабление компульсивноподобного поведения, а как результат нарушения двигательной активности мышей, что согласуется с данными литературы [8]. Применение баклофена в дозах 0.1 и 1 мг/кг не сопровождалось нарушением двигательной координации животных, но приводило к уменьшению количества зарытых шариков, что может свидетельствовать об ослаблении компульсивноподобного поведения мышей в этом тесте. В то же время при совместном введении баклофена и 8-ОН-DPAT были обнаружены противоположные эффекты. В частности, была отмечена тенденция к ослаблению компульсивноподобного поведения, вызванного 8-ОН-DPAT, при его совместном применении с баклофеном в дозе 0.1 мг/кг, а в дозе 1 мг/кг баклофен, напротив, усиливал эффект 8-ОН-DPAT — увеличивал количество повторных выборов животными целевых рукавов Y-лабиринта. Подобная зависимость эффектов баклофена от дозы может быть обусловлена воздействием на разные мишени.

Известно, что баклофен способен повышать активность серотонинергических нейронов ядер шва в малых дозах и, как следствие, уровень серотонина в обла-

стях их проекций [15], что некоторые авторы связывают с избирательной стимулирующей пресинаптических ГАМК_B-рецепторов, расположенных на несеротонинергических нейронах [15, 16]. С другой стороны, баклофен является не только агонистом ГАМК_B-рецепторов, но и модулятором хемокиновых рецепторов 4-го типа (CXCR4) [22], которые экспрессируются в том числе в нейронах коры головного мозга, гиппокампа, таламуса, базальных ядер, ствола головного мозга и мозжечка [23]. Установлено, что нокаут гена CXCR4 у мышей приводит к усилению стереотипного поведения [24], которое характерно для многих психических расстройств, включая ОКР [25]. Ослабление компульсивноподобного поведения мышей после применения баклофена в дозе 0.1 мг/кг может быть обусловлено стимуляцией CXCR4, а не ГАМК_B-рецепторов. Это подтверждается, во-первых, отсутствием влияния баклофена в дозе 0.1 мг/кг на двигательную активность мышей, которое обычно связывают с ГАМК_B-рецепторами [20, 21, 26]. Во-вторых, CXCR4 расположены на серотонинергических нейронах ядер шва и могут участвовать в регуляции высвобождения серотонина напрямую, а также опосредованно из-за пресинаптической локализации на глутаматергических и ГАМКергических нейронах [27]. Это может обуславливать антагонизм между баклофеном в малых дозах и 8-ОН-DPAT, который подавляет активность серотонинергических нейронов через стимуляцию 5-HT_{1A}-ауторецепторов [14]. Отсутствие значимого эффекта баклофена в дозе 0.1 мг/кг также согласуется с особенностями модуляции серотонинергической синаптической передачи флуоксетином, селективным ингибитором обратного захвата серотонина, который ослабляет нарушение спонтанного чередования у грызунов в Y-лабиринте, вызванное введением 8-ОН-DPAT, только после хронического введения [2, 14, 28], но не с эффектами антагониста 5-HT_{1A}- и агонистом D₄-рецепторов WAY100635 [28], метилendioксиметамфетамина (МДМА), усиливающего экзоцитоз 5-HT [28], блокатора H₃- и H₄-рецепторов тиоперамида [29], также усиливающих серотонинергическую синаптическую передачу и ослабляющих вызванные 8-ОН-DPAT нарушения спонтанного чередования у мышей после однократного введения.

Следовательно, представляется актуальным дальнейшее изучение влияния баклофена в малых дозах на компульсивноподобное поведение грызунов после хронического введения.

Усиление компульсивноподобного поведения — увеличение количества повторных выборов животными целевых рукавов Y-лабиринта после совместного введения 8-ОН-DPAT и баклофена в дозе 1 мг/кг может быть обусловлено влиянием последнего на ГАМК_B-рецепторы, расположенные на серотонинергических нейронах ядер шва. В данном случае стимуляция 5-HT_{1A}- и ГАМК_B-рецепторов серотонинергических нейронов приводит к прямому ингибированию их активности [16, 30], что, в свою очередь, сопровождается уменьшением внеклеточного уровня серотонина в областях проекций этих нейронов [31, 32]. Косвенно это предположение также подтверждается тенденцией к нарушению двигательной координации мышей в тесте “Вращающийся стержень” после введения баклофена в дозе 1 мг/кг, что может свидетельствовать об активности баклофена в отношении ГАМК_B-рецепторов.

Производное 4-фенилпирролидона ГИЖ-290 во всех исследуемых дозах ослабляло компульсивноподобное поведение мышей в тесте “Закапывание шариков”, но не оказывало влияния на нарушение спонтанного чередования в Y-лабиринте, вызванное введением 8-ОН-DPAT, и двигательную координацию животных в тесте “Вращающийся стержень”. Согласно результатам проведенных ранее исследований, механизм действия ГИЖ-290 может быть связан с модуляцией mGluR II и ГАМК_B-рецепторов [9, 10]. Возможная связь между ГАМК_B-рецепторами и компульсивноподобным поведением обсуждалась выше, однако отличный от бакло-

фена поведенческий паттерн и отсутствие влияния ГИЖ-290 на двигательную координацию мышей могут указывать на отсутствие значимого вклада данной мишени в реализацию антикомпульсивного эффекта ГИЖ-290, либо же на иной характер взаимодействия изучаемого вещества с ГАМК_B-рецепторами. Возможная роль mGluR II может быть косвенно подтверждена способностью антагонистов mGluR2/3 ослаблять компульсивноподобное поведение мышей в тесте “Закапывание шариков” [11], а также согласуется с аналогичным эффектом других модуляторов глутаматергической синаптической передачи — адамантанов [12] и N-ацетилцистеина [13] в этом тесте и их клинической эффективностью в терапии ОКР [33].

Таким образом, баклофен и ГИЖ-290 во всех исследуемых дозах ослабляли компульсивноподобное поведение мышей в тесте “Закапывание шариков”, но не на модели нарушения спонтанного чередования, вызванного введением 8-ОН-ДРАТ. Этот эффект баклофена в дозе 5 мг/кг сопровождался нарушением двигательной координации мышей в тесте “Вращающийся стержень”, что, по-видимому, является следствием центрального миорелаксирующего действия и не отражает влияние баклофена на компульсивноподобное поведение.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям биоэтического комитета НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (протокол заседания №8 от 10.06.2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской программы по теме “Создание методологии лечения тревожно-депрессивных и нейродегенеративных заболеваний на основе фармакологической регуляции системных механизмов нейропротекции”, запланированной в ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В.В. Закусова”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование исследования (Н.В.К. и Т.А.В.), выполнение экспериментальной работы (Н.В.К., А.В.В., Я.С.К., А.А.Ш., А.О.К.), обработка данных (Н.В.К., П.Л.Н.), написание и редактирование рукописи (Н.В.К., А.В.В., Я.С.К., А.А.Ш., П.Л.Н., А.О.К., Т.А.В.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stein DJ, Costa DLC, Lochner C, Miguel EC, Reddy YCJ, Shavitt RG, van den Heuvel OA, Simpson HB (2019) obsessive-compulsive disorder. *Nat Rev Dis Primers* 5(1): 52.
<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0102-3>
2. Alonso P, López-Solà C, Real E, Segalàs C, Menchón JM (2015) Animal models of obsessive-compulsive disorder: utility and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 11: 1939–1955.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S62785>
3. Biria M, Banca P, Healy MP, Keser E, Sawiak SJ, Rodgers CT, Rua C, de Souza AMFLP, Marzuki AA, Sule A, Ersche KD, Robbins TW (2023) Cortical glutamate and GABA are related to compulsive behaviour in individuals with obsessive compulsive disorder and healthy controls. *Nat Commun* 14(1): 3324.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-38695-z>

4. Li Y, Zhang CC, Kathrin Weidacker, Zhang Y, He N, Jin H, Chen W, Voon V, Edden RAE, Yan F (2019) Investigation of anterior cingulate cortex gamma-aminobutyric acid and glutamate-glutamine levels in obsessive-compulsive disorder using magnetic resonance spectroscopy. *BMC Psychiatry* 19(1): 164.
<https://doi.org/10.1186/s12888-019-2160-1>
5. Richter MA, de Jesus DR, Hoppenbrouwers S, Daigle M, Deluce J, Ravindran LN, Fitzgerald PB, Daskalakis ZJ (2012) Evidence for Cortical Inhibitory and Excitatory Dysfunction in Obsessive Compulsive Disorder. *Neuropsychopharmacology* 37(5): 1144–1151.
<https://doi.org/10.1038/npp.2011.300>
6. Zhang Z, Fan Q, Bai Y, Wang Z, Zhang H, Xiao Z (2016) Brain Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Concentration of the Prefrontal Lobe in Unmedicated Patients with Obsessive-Compulsive Disorder: A Research of Magnetic Resonance Spectroscopy. *Shanghai Arch Psychiatry* 28(5): 263–270.
<https://doi.org/10.11919/j.issn.1002-0829.216043>
7. Zai G, Arnold P, Burroughs E, Barr CL, Richter MA, Kennedy JL (2005) Evidence for the gamma-amino-butyric acid type B receptor 1 (GABBR1) gene as a susceptibility factor in obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 134B(1): 25–29.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30152>
8. Egashira N, Abe M, Shirakawa A, Niki T, Mishima K, Iwasaki K, Oishi R, Fujiwara M (2013) Effects of mood stabilizers on marble-burying behavior in mice: involvement of GABAergic system. *Psychopharmacology (Berl)* 226(2): 295–305.
<https://doi.org/10.1007/s00213-012-2904-9>
9. Kovalev IG, Vasil'eva EV, Kondrakhin EA, Voronina TA, Kovalev GI (2017) The role of glutamate and GABA receptors in the anticonvulsive effects of levetiracetam and a 4-phenylpirrolidone derivative (GIZh-290) in rats. *Neurochem J* 11: 332–339.
<https://doi.org/10.1134/S1819712417040055>
10. Sukhorukova NA, Vasil'eva EV, Kovalev GI (2023) Phenibut, Semax, and GIZh-290 Modulate Cortical mGluII Receptors in an Attention Deficit Model in Mice. *Neurochem J* 17: 224–229.
<https://doi.org/10.1134/S1819712423020137>
11. Bernalov AY, van Gaalen MM, Sukhotina IA, Wicke K, Mezler M, Schoemaker H, Gross G (2008) Behavioral characterization of the mGlu group II/III receptor antagonist, LY-341495, in animal models of anxiety and depression. *Eur J Pharmacol* 592(1-3): 96–102.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.089>
12. Egashira N, Okuno R, Harada S, Matsushita M, Mishima K, Iwasaki K, Nishimura R, Oishi R, Fujiwara M (2008) Effects of glutamate-related drugs on marble-burying behavior in mice: implications for obsessive-compulsive disorder. *Eur J Pharmacol* 586(1-3): 164–170.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.035>
13. Egashira N, Shirakawa A, Abe M, Niki T, Mishima K, Iwasaki K, Oishi R, Fujiwara M (2012) N-acetyl-L-cysteine inhibits marble-burying behavior in mice. *J Pharmacol Sci* 119(1): 97–101.
<https://doi.org/10.1254/jphs.11228sc>
14. Arora T, Bhowmik M, Khanam R, Vohora D (2013) Oxcarbazepine and fluoxetine protect against mouse models of obsessive compulsive disorder through modulation of cortical serotonin and creb pathway. *Behav Brain Res* 247: 146–152.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.038>
15. Takahashi A, Shimamoto A, Boyson CO, DeBold JF, Miczek KA (2010) GABA(B) receptor modulation of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus and escalation of aggression in mice. *J Neurosci* 30(35): 11771–11780.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1814-10.2010>
16. Abellán MT, Adell A, Honrubia MA, Mengod G, Artigas F (2000) GABAB-RI receptors in serotonergic neurons: effects of baclofen on 5-HT output in rat brain. *Neuroreport* 11(5): 941–945.
<https://doi.org/10.1097/00001756-200004070-00009>
17. Witkin JM (2008) Animal models of obsessive-compulsive disorder. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 9: Unit 9 30.
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0930s45>
18. Jakkamsetti V, Scudder W, Kathote G, Ma Q, Angulo G, Dobariya A, Rosenberg RN, Beutler B, Pascual JM (2021) Quantification of early learning and movement sub-structure predictive of motor performance. *Sci Rep* 11(1): 14405.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-93944-9>
19. Kudryashov NV, Volkova AV, Shimshir AA, Naplekova PL, Voronina TA, Seredenin SB (2023) Specifics of Experimental Modeling 8-OH-DPAT-Induced Perseverative Behavior in Mice. *Bull Exp Biol Med* 175(1): 41–44.
<https://doi.org/10.1007/s10517-023-05807-0>
20. Li X, Risbrough VB, Cates-Gatto C, Kaczanowska K, Finn MG, Roberts AJ, Markou A (2013) Comparison of the effects of the GABAB receptor positive modulator BHF177 and the GABAB receptor agonist baclofen on anxiety-like behavior, learning, and memory in mice. *Neurophar-*

- macology 70: 156–167.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.01.018>
21. *McNamara RK, Skelton RW* (1996) Baclofen, a selective GABAB receptor agonist, dose-dependently impairs spatial learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53(2): 303–308.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02025-x](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02025-x)
 22. *Guyon A, Kussrow A, Olmsted IR, Sandoz G, Bornhop DJ, Nahon JL* (2013) Baclofen and other GABAB receptor agents are allosteric modulators of the CXCL12 chemokine receptor CXCR4. *J Neurosci* 33(28): 11643–11654.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6070-11.2013>
 23. *Jiang Z, Zhou W, Guan S, Wang J, Liang Y* (2013) Contribution of SDF-1 α /CXCR4 signaling to brain development and glioma progression. *Neurosignals* 21(3-4): 240–258.
<https://doi.org/10.1159/000339091>
 24. *Cash-Padgett T, Sawa A, Jaaro-Peled H* (2016) Increased stereotypy in conditional *Cxcr4* knockout mice. *Neurosci Res* 105: 75–79.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.10.001>
 25. *Ghosh D, Rajan PV, Erenberg G* (2013) A comparative study of primary and secondary stereotypies. *J Child Neurol* 28(12): 1562–1568.
<https://doi.org/10.1177/0883073812464271>
 26. *Colombo G, Melis S, Brunetti G, Serra S, Vacca G, Carai MA, Gessa GL* (2001) GABA(B) receptor inhibition causes locomotor stimulation in mice. *Eur J Pharmacol* 433(1): 101–104.
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01494-7](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01494-7)
 27. *Heinisch S, Kirby LG* (2010) SDF-1 α /CXCL12 enhances GABA and glutamate synaptic activity at serotonin neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 58(2): 501–514.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.08.022>
 28. *Odland AU, Jessen L, Fitzpatrick CM, Andreasen JT* (2019) 8-OH-DPAT Induces Compulsive-like Deficit in Spontaneous Alternation Behavior: Reversal by MDMA but Not Citalopram. *ACS Chem Neurosci* 10(7): 3094–3100.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00593>
 29. *Verma L, Agrawal D, Jain NS* (2018) Enhanced central histaminergic transmission attenuates compulsive-like behavior in mice. *Neuropharmacology* 138: 106–117.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.05.031>
 30. *Cornelisse LN, Van der Harst JE, Lodder JC, Baarendse PJ, Timmerman AJ, Mansvelder HD, Spruijt BM, Brussaard AB* (2007) Reduced 5-HT1A- and GABAB receptor function in dorsal raphe neurons upon chronic fluoxetine treatment of socially stressed rats. *J Neurophysiol* 98(1): 196–204.
<https://doi.org/10.1152/jn.00109.2007>
 31. *Innis RB, Aghajanian GK* (1987) Pertussis toxin blocks 5-HT1A and GABAB receptor-mediated inhibition of serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol* 143: 195–204.
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(87\)90533-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(87)90533-4)
 32. *Tao R, Ma Z, Auerbach SB* (1996) Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABAA and GABAB receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. *Br J Pharmacol* 119: 1375–1384.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb16049.x>
 33. *Naderi S, Faghih H, Aqamolaei A, Mortazavi SH, Mortezaei A, Sahebolzamani E, Rezaei F, Akhondzadeh S* (2019) Amantadine as adjuvant therapy in the treatment of moderate to severe obsessive-compulsive disorder: A double-blind randomized trial with placebo control. *Psychiatr Clin Neurosci* 73(4): 169–174.
<https://doi.org/10.1111/pcn.12803>

Baclofen and 4-Phenylpyrrolidone Derivative GIZH-290 Attenuates Compulsive-Like Behavior in Mice

N. V. Kudryashov^{a,*}, A. V. Volkova^a, Ya. S. Kozin^a, A. A. Shimshirt^a, P. L. Naplekova^a,
A. O. Korolev^a, and T. A. Voronina^a

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

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

Obsessive-compulsive disorder (OCD) is a mental disease characterized by the obsessions which cause marked distress or anxiety and/or compulsions intended to alleviate this distress. The results of experimental and clinical studies suggest a possible role of GABA_B receptors in the pathogenesis of OCD, making it relevant to study the effect of ligands of these receptors on the behavior of rodents. *Objectives:* Studying the effects of

GIZH-290 and baclofen in animal models of OCD. *Methods.* The effects of GIZH-290 (0.01, 0.1, 1 mg/kg, i.p.) and baclofen (0.1, 1, and 5 mg/kg, i.p.) were studied in the marble burying test and the rotarod test, as well as in the 8-OH-DPAT-induced decrease in spontaneous alternation in mice. *Results.* Baclofen and GIZH-290 attenuated compulsive-like behavior in mice by reducing the number of buried marbles in the marble burying test at all tested doses. However, the effect of baclofen at a dose of 5 mg/kg was accompanied by a disruption of the animals' motor coordination in the rotarod test. At the same time, neither baclofen nor GIZH-290 attenuated 8-OH-DPAT-induced (2 mg/kg, i.p.) decrease in spontaneous alternation behavior in mice. On the contrary, baclofen at a dose of 1 mg/kg exacerbated this disruption. *Conclusion.* Baclofen and GIZH-290 have anticomulsive activity in the marble burying test, but not in the 8-OH-DPAT-induced decrease in spontaneous alternation behavior in mice.

Keywords: obsessive-compulsive disorder, GABA_B receptor, baclofen, mouse, 8-OH-DPAT, GIZH-290, marble burying test

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ПРИНУДИТЕЛЬНЫХ БЕГОВЫХ НАГРУЗОК НА СОДЕРЖАНИЕ
ИЗОФОРМ Na^+/K^+ -АТФазы И ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ
В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ МЫШЕЙ С МОДЕЛЮ
САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА**

© 2023 г. А. Н. Захарова¹, К. Г. Милованова¹, А. А. Орлова¹, Е. Ю. Дьякова¹,
Ю. Г. Калининкова¹, О. В. Коллантай¹, И. Ю. Шувалов¹,
А. В. Чибалин¹, Л. В. Капилевич¹, *

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

*E-mail: kapil@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.09.2023 г.

После доработки 20.10.2023 г.

Принята к публикации 31.10.2023 г.

Изучено влияние принудительного бега в течение 1 ч ежедневно на протяжении 4 недель на содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы и одновалентных катионов в скелетных мышцах мышей с моделью сахарного диабета II типа (СД II). Для формирования модели заболевания использовалась высокожировая диета, физические нагрузки в виде принудительного бега проводились в течение 4 недель. Содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы и ионов Na^+ и K^+ в мышечной ткани *m. gastrocnemius* определялась методом вестерн-блоттинга и атомной абсорбционной спектрофотометрии соответственно. Показано, что формирование СД II у мышей сопровождается изменением содержания изоформ альфа 1 и 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани. Эффект принудительных беговых нагрузок на содержание Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани выражен значительно и прежде всего различается в возрастных группах. Также можно отметить определенную зависимость влияния принудительных беговых нагрузок на содержание данного фермента от времени их применения. У молодых животных изменения концентрации одновалентных катионов натрия и калия после принудительных беговых нагрузок были выражены в меньшей степени. У возрастных мышей с моделью СД на фоне принудительных нагрузок наблюдалось возрастание содержания натрия и снижение содержания калия в мышечной ткани. Обнаруженные изменения обмена одновалентных катионов в мышечной ткани мышей при СД II под влиянием принудительных беговых нагрузок могут играть роль в реализации метаболических эффектов физической активности.

Ключевые слова: одновалентные катионы, Na^+/K^+ -АТФаза, беговая нагрузка, сахарный диабет

DOI: 10.31857/S0869813923120142, **EDN:** CHNRKQ

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет II типа (СД II) считают одной из важнейших проблем современности, на него приходится около 90% случаев диабета. Его патогенез связан с резистентностью к инсулину в периферических тканях и вследствие этого возрастанием концентрации глюкозы в крови [1–3]. Несмотря на значительное количество исследований метаболизма глюкозы, молекулярные механизмы его регуляции

в норме и патологии остаются недостаточно изученными [4]. Особенно актуальным остается и вопрос немедикаментозного лечения метаболических расстройств, в том числе, и при помощи физических нагрузок. Метаболические изменения под влиянием физических нагрузок — очень сложный процесс, который одновременно включает интегративные и адаптивные реакции в некоторых тканях и органах на клеточном и системном уровне [5, 6].

Одной из моделей формирования диабета является содержание животных на высокожировой диете. Питание с высоким содержанием жиров может привести к ожирению, гиперинсулинемии и измененному гомеостазу глюкозы из-за недостаточной компенсации со стороны островков Лангерганса [7]. Поскольку ожирение в этом случае вызвано манипуляциями с питанием, а не с цитотоксическими веществами, считается, что такие модели более сходны с заболеванием у человека.

Мышечная ткань является основным потребителем энергии, где химическая энергия жирных кислот и глюкозы преобразуется в механическую [8]. Кроме того, мышечные клетки при сокращении способны продуцировать белковые сигнальные молекулы — миокины. Спектр вырабатываемых миокинов и их роль в метаболических процессах достаточно разнообразна. Миокины с помощью противовоспалительного воздействия на сами мышцы могут противодействовать резистентности к инсулину [9]. Кроме того, при физических упражнениях экспрессируются белковые молекулы, вовлеченные в процессы гликолиза и метаболизм аминокислот [10]. Следует отметить, что физическая активность оказывает естественное противовоспалительное действие и способствует активации метаболических процессов [11]. Поэтому мышечной ткани может принадлежать значительная роль в коррекции метаболических нарушений. В предыдущих исследованиях нами было доказано, что содержание в крови некоторых цитокинов (IL-6, IL-8, IL-15, LIF) при различных физических нагрузках изменяется неодинаково [12, 13]. Поэтому предполагается, что эндокринные эффекты мышечной ткани также разнообразны в зависимости от режимов мышечного сокращения.

Однако механизмы влияния физической активности на резистентность мышечной ткани к инсулину при СД II до сих пор остаются предметом дискуссии. При этом внимание исследователей все больше привлекает роль одновалентных катионов в этих процессах. В многочисленных исследованиях было показано, что как у человека, так и у экспериментальных животных интенсивные физические упражнения способствуют увеличению $[Na^+]_i$ в 3–4 раза и уменьшению $[K^+]_i$ до 50% в скелетных мышцах за счет активации ионных каналов. Было также продемонстрировано, что выход K^+ из мышечных клеток во время упражнений приводит к повышению $[K^+]$ в интерстициальной жидкости скелетных мышц от 4–5 до 11–15 мМ. У людей интенсивные динамические и статические упражнения приводят к 2-кратному повышению уровня $[K^+]$ в венозной крови из-за его выхода из скелетных мышц, которые являются основным источником внутриклеточного K^+ в организме [14–20].

Увеличение внутриклеточного соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ является достаточным условием изменения транскрипции десятков универсальных и сотен тканеспецифических генов [21]. В ряде случаев эти изменения транскрипции не связаны с возможным приростом $[Ca^{2+}]_i$. Было показано, что в условиях гипоксии наблюдается увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$, что может быть достаточным условием для изменения транскриптома этих клеток [21]. Было обнаружено, что диссипация трансмембранного градиента одновалентных катионов, вызванная ингибированием Na^+/K^+ -АТФазы, приводит к увеличению транскрипции генов *PTGS2* и *NR4A1* с помощью Ca-кальмодулин-опосредованного фосфорилирования транскрипци-

онного фактора, способного связывать CRE-последовательности ДНК (CREB) и опосредованного кальцинеином дефосфорилирования ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) соответственно [21]. В наших предыдущих работах [22–24] доказано влияние диссипации градиентов одновалентных катионов на экспрессию генов и продукцию миокинов.

В литературе отмечается снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы у больных СД по сравнению с лицами без диабета. Это снижение описано как в клетках скелетных мышц [25], так и миокарда [26] и эритроцитов [27]. При этом активность Na^+/K^+ -АТФазы не имела зависимости от возраста и пола обследованных лиц, оставалась низкой при всех сроках заболевания и недостоверно снижалась с увеличением продолжительности диабета. В то же время данный показатель имел обратную зависимость от уровня HbA1c.

Таким образом, поскольку сократительная активность мышечных клеток сопровождается диссипацией градиентов одновалентных катионов, которая является пусковым фактором изменения транскрипции генов [28–31], этот механизм можно рассматривать как один из вариантов пути реализации эффектов физической активности при сахарном диабете.

В связи со всем изложенным целью нашего исследования было изучить влияние физических нагрузок на содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы и моновалентных катионов в скелетных мышцах мышей с моделью сахарного диабета II типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовались мыши-самцы линии C57bl/6. Мыши были получены из вивария Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга. Режим содержания животных: день/ночь: 12/12 ч, световой день начинался с 6:00, свободный доступ к пище и воде, температура в помещении 24°C.

Схема эксперимента представлена на рис. 1. Были сформированы экспериментальные группы мышей различного возраста. Группа молодых животных включалась в эксперимент в возрасте 4-х нед., группа возрастных животных включалась в эксперимент в возрасте 32-х нед.

Эксперимент продолжался 16 нед. До 12-й недели мыши каждой возрастной группы были разделены на 2 подгруппы (рис. 1):

- животные, находившиеся на жировой диете – 28 мышей;
- животные, получавшие стандартный рацион – 28 мышей;

Для формирования модели сахарного диабета II типа (СД II) использовалась высокожировая диета в течение 12 нед., которая была разработана специально для данного эксперимента. Корм для первой группы был приготовлен на основе описанного выше корма “Прокорм” (50%) с включением животного (свиной жир) (20%) и растительного (подсолнечное масло) (10%) жира, сахара (15%), сухого молока (5%); калорийность – 5100 ккал/кг, в том числе на долю жиров приходилось 59% калорийности. Продукты измельчались в блендере в гомогенную смесь, после чего масса формировалась в гранулы диаметром до 10 мм и высушивалась в духовом шкафу при 300°C. Корм приготавливался на 5 дней и хранился при –20°C. В предварительных исследованиях, опубликованных нами ранее [32], было показано, что использование высокожировой диеты у мышей приводит к увеличению массы тела и формированию ожирения, гипергликемии, снижению толерантности к глюкозе и гиперинсулинемии. Все это свидетельствует о высокой степени адекватности разработанной экспериментальной модели заболеванию диабетом II типа.

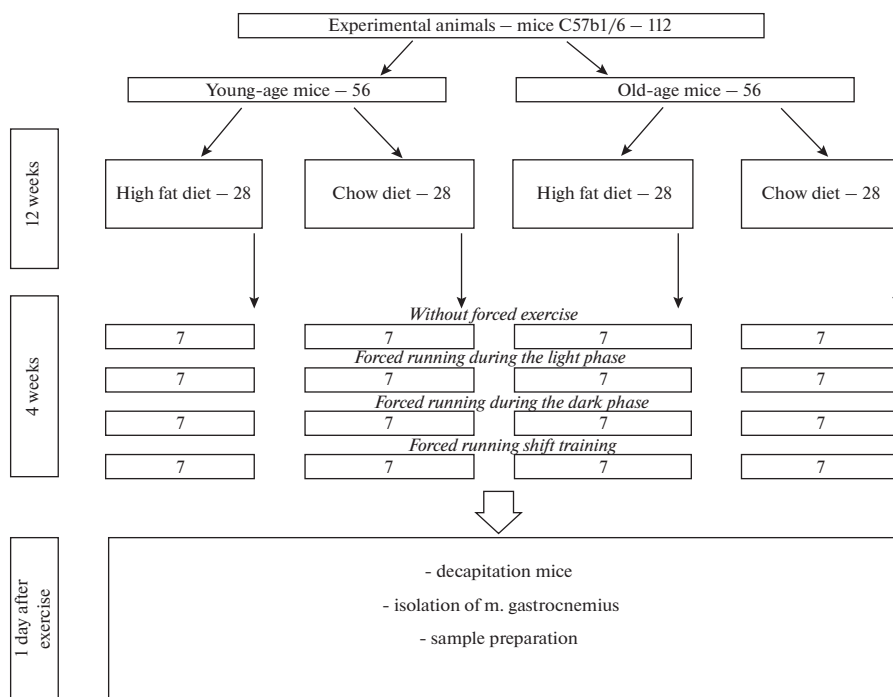


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

Вторая группа питалась кормом для лабораторных животных “Прокорм” (ЗАО Биопро, Новосибирск): пшеница, ячмень, отруби, глютен кукурузный, мука рыбная, белковая кормосмесь, масло подсолнечное, шрот соевый; калорийность – 3000 ккал/кг, в том числе на долю жиров приходилось 18% калорийности.

Начиная с 12-ой недели каждая группа животных была поделена на подгруппы – подвергавшихся (основная – 21 животное) и не подвергавшихся (контрольная – 7 животных) принудительным беговым нагрузкам (рис. 1).

Различные подгруппы основной группы мышей подвергались беговой нагрузке в разное время суток.

Группа А – подвергались беговой нагрузке в светлое время суток (с 8-00 до 10-00 ч) – 7 животных;

Группа В – подвергались беговой нагрузке в темное время суток (с 19-00 до 21-00 ч) – 7 животных;

Группа С – время принудительной беговой нагрузки чередовалось (переменный режим): первую и третью недели в темное время суток (с 19-00 до 21-00 ч), вторую и четвертую недели – в светлое время суток (с 8-00 до 10-00 ч) – 7 животных.

Для нормирования нагрузки была использована разработанная по нашему заказу беговая дорожка для мышей BMELAB SID-TM10 [33]. Принуждение к бегу осуществлялось электрическим раздражением, напряжение подавалось на металлическую сетку, расположенную на задней стенке камеры. Дорожка имела тумблер включения ленты, тумблер включения тока, регулятор скорости движения ленты, регулятор силы тока, рычаг изменения угла наклона ленты. Мыши на дорожке были изолированы друг от друга стенками из оргстекла. Покрытие движущейся ленты имело резиновую шероховатую поверхность. Сверху дорожка закрывалась прозрачной крышкой из оргстекла.

Принудительные беговые нагрузки проводились в течение 4 нед. 6 раз в неделю, продолжительность нагрузки постепенно увеличивалась в течение первых 6 дней с 10 до 60 мин (прирост 10 мин в день) и не изменялась больше на протяжении следующих 3 нед. Каждую неделю изменялся угол подъема полотна беговой дорожки (от 0 до 10°) и скорость ее вращения (от 15 до 18 м/мин). Один раз в неделю нагрузки не выполнялись (на 7-й день).

Умерщвление экспериментальных животных проводилось методом декапитации через 24 ч после последней нагрузки. С обеих задних конечностей выделялись *m. gastrocnemius*, мышечная ткань очищалась от соединительной и жировой ткани.

Определение Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани

Гомогенизацию мышечной ткани для вестерн-блоттинга проводили следующим образом: перед лизисом ткань сначала разрезали скальпелем на стеклянной пластине, находящейся на льду, на небольшие кусочки размером ~1 мм. Затем их переносили в холодный 1X RIPA буфер, содержащий (мМ) 137 NaCl, 2.7 KCl, 1 MgCl_2 , 0.5 Na_3VO_4 , 1% Triton X-100, 10% глицерина, 20 мМ Триса – pH 7, 1 мкг/мл лейпептина, 0.2 ПМСФ, 10 NaF, 1 ЭДТА, 1 ДТТ, 5 пиродифосфата натрия, 100 бензамидина) в специальные пробирки для гомогенизации с закручивающимися крышками и утолщенными стенками. Использовали 50 мкл буфера на 20 мг влажной мышечной ткани. Во время обработки материал хранился на льду. Затем в пробирки помещали металлические шарики диаметром 5 мм (Qiagen, Германия). Пробирки помещали в вихревой лабораторный миксер Digital Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., США) на 15 мин при 4°С. Затем оставляли на мини-ротатор-шейкере (MP-1, Biosan, Латвия) в холодильнике на 1 ч. Далее центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 мин при 4°С и переносили прозрачный супернатант в новые четко маркированные пробирки. Отбиралось 20 мкл для определения концентрации общего белка в образце (метод Брэдфорда).

Для определения концентрации изоформ Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани проводили электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях согласно методу Laemmli (1970), используя 5%-ный концентрирующий (приготовлен на буферном растворе, содержащем 0.5 М трис-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS) и 10%-ный разделяющий (приготовлен на буферном растворе, содержащем 1.5 М трис-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS) гели. Камеру для электрофореза заполняли буфером, который содержал 1.92 М глицина, 250 мМ Tris-HCl (pH 8.6) и 1% SDS. Стоковый раствор полиакриламида содержал 30% акриламида и 0.8% N,N-метилен-бис-акриламида. Образцы белка для электрофореза готовили из общего гомогената мышцы, используя 4-кратный буфер (250 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 8% SDS, 40% сахарозы, 0.05% бромфенолового синего, 5% β-меркаптоэтанола) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Для контроля молекулярной массы белка использовались маркеры молекулярной массы (Bio-Rad, США). Электрофорез проводили, используя камеру Mini-Protean III (Bio-Rad, США), начиная при силе тока 25 мА. После вхождения образцов в разделяющий гель силу тока увеличивали до 50 мА. Количество общего белка, нанесенного в каждую лунку, составляло 10 мкг. После электрофореза белки переносили из геля на PVDF мембрану (Bio-Rad, США) в буфере для переноса (25 мМ триса, 192 мМ глицина (pH 8.3), 20% этанола) в течение 1.5 ч при силе тока 400 мА. Для подготовки мембраны к иммунохимическому окрашиванию ее промывали несколько раз в растворе TBS (50 мМ Tris, pH 7.4, 150 мМ NaCl). Далее проводили блокирование 5%-ным сухим обезжиренным молоком (Bio-Rad, США), приготовленным на PBSt (PBS с добавлением Твин-20 0.1%). Блокировали в течение часа при комнатной температуре и при постоянном перемешивании.

Белки-мишени определяли путем инкубации в течение ночи при 4°C в 5%-ном сухом молоке в TBSt (100 мМ Трис, 1.5 М NaCl, 1% Твин-20) в разведении 1 : 1000 с первичными кроличьими поликлональными антителами против альфа-2-субъединицы Na⁺/K⁺-АТФазы (кат. № АВ9094-I, Sigma-Aldrich, США) и против альфа-1-субъединицы Na⁺/K⁺-АТФазы (кат. № 05-369, Sigma-Aldrich, США). Затем образец инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (антимышинные, кат. № 1706516, антикроличьи, кат. № 1706515, BioRad, США) в течение 1 ч при комнатной температуре в 5%-ном сухом молоке в TBSt.

Комплексы антиген-антитело визуализировали с помощью набора ECL (Super-Signal West Dura, Thermo Scientific, США) и системы документирования (Chemi-Doc-It 2, UVP, Великобритания). Денситометрический анализ проводили с помощью программного обеспечения ImageJ. Данные вестерн-блоттинга представлены в относительных единицах по сравнению с контролем. В качестве референсного белка брали один образец белка у животного контрольной группы, и он служил референсным белком для всех остальных определений. Контрольные значения принимались за 100%.

Определение концентрации ионов Na⁺ и K⁺ в мышечной ткани

Препарирование мышц проводили с PBS буфером на льду, после выделения образца помещали в промыточный раствор (100 мМ MgCl₂, 10 мМ Tris-HCl, pH 7.4) на льду и инкубировали в течение 15 мин, затем раствор меняли на свежий, данную процедуру повторяли 4 раза. Извлеченную мышцу взвешивали и разрезали на мелкие части, после чего помещали в микропробирку, содержащую 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), для полного извлечения ионов из ткани.

Через сутки содержимое микропробирок гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком. После этого дополнительно проводили ультразвуковую дезинтеграцию образцов с использованием “Bradson 450 Digital Sonifier” (Marshall Scientific) в течение 30 с с мощностью 15% от максимальной амплитуды, повторяли процедуру 3 раза до полной гомогенности суспензии. Полученный образец центрифугировали при 18000 g в течение 10 мин, супернатант переносили в пробирку для последующего измерения концентрации ионов. К осадкам добавляли лизирующий RIPA буфер, содержащий коктейль ингибиторов протеаз. При определении концентрации белка использовали модифицированный метод Лоури.

Содержание Na⁺ и K⁺ в экстрактах ТХУ определяли методом пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии с использованием спектрометра “Квант-2м1” (Кортек, Россия) со смесью пропан–воздух. Для калибровки использовали растворы KCl (0.5–4 мг/л K⁺) и NaCl (0.05–2 мг/л Na⁺), содержащие 5% ТХУ. Содержание Na⁺ и K⁺ каждой пробы нормализовали по влажному весу соответствующей мышцы. Все растворы готовили с использованием дважды деионизованной воды.

Методы статистического анализа

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Graph-Pad Prism. Уровень значимости при проверке гипотезы принадлежности двух выборок к одной генеральной совокупности оценивали по Kruskal–Wallis ANOVA test. Все данные имели ненормальное распределение признака. Для сравнения групп использовался двусторонний дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки и поправкой Холма–Сидака. Данные представлены в виде среднего значения и среднего квадратичного отклонения.

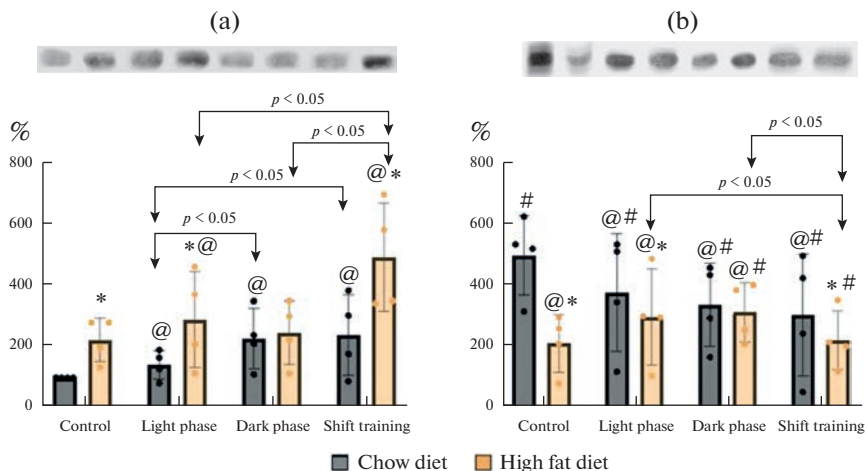


Рис. 2. Концентрация изоформы Na^+/K^+ -АТФазы альфа 1 в мышечной ткани мышей. Панель (а) — молодые мыши; панель (б) — возрастные мыши. Данные представлены как среднее $\pm$ среднее квадратичное отклонение. * — достоверность различий ($p < 0.05$) с группой со стандартной диетой; # — достоверность различий ($p < 0.05$) с группой молодых мышей; @ — достоверность различий ($p < 0.05$) с контролем.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой части работы методом вестерн-блоттинга определялось содержание изоформ альфа 1 и альфа 2 Na^+/K^+ -АТФаз.

На рис. 2 представлено содержание изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани экспериментальных животных. Результаты представлены в процентах от контроля, за 100% принято содержание данного белка в мышечной ткани молодых мышей, находящихся на обычной диете и не подвергавшихся принудительному бегу.

Как видно из рис. 2а, жировая диета у молодых животных способствует увеличению содержания изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки способствовали увеличению содержания данного белка как у животных, получавших стандартную диету, так и жировую, но во втором случае — достоверно выше. Наибольший эффект оказывали занятия в переменном режиме, содержание изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани при этом возрастало в 4 раза. Эффекты занятий в темную и светлую фазу различались незначительно, особенно у мышей, получавших жировую диету. У животных, получавших стандартную диету, влияние принудительных беговых нагрузок на содержание данного фермента было выражено сильнее, если применялось в темную фазу, в сравнении со светлой.

Как видно из рис. 2б, у возрастных животных контрольной группы содержание изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани значительно выше по сравнению с молодыми животными. При этом питание жировой диетой у возрастных животных способствует снижению содержания данного фермента. Принудительные беговые нагрузки способствовали снижению содержания данного белка у животных, получавших стандартную диету независимо от режима нагрузок. Но содержание его все равно оставалось выше, чем у молодых животных, подвергавшихся аналогичным нагрузкам. Напротив, у животных, получавших жировую диету, со-

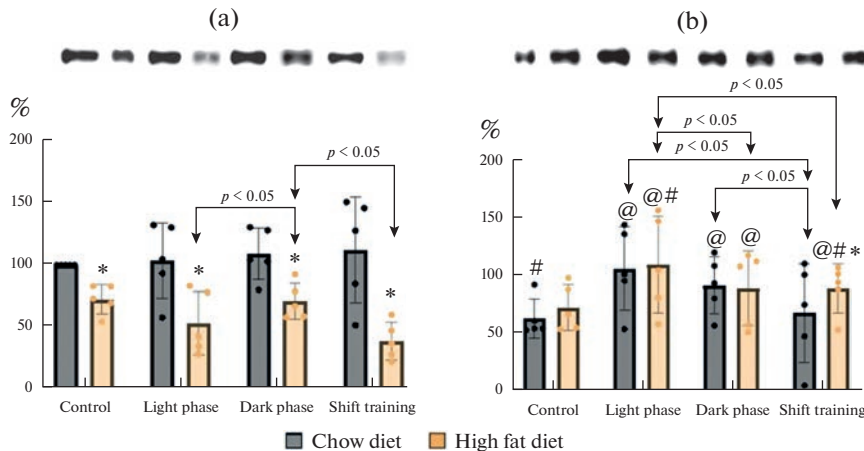


Рис. 3. Концентрация изоформы Na⁺/K⁺-АТФазы альфа 2 в мышечной ткани мышей. Панель (а) — молодые мыши; панель (б) — возрастные мыши. Данные представлены как среднее ± среднее квадратичное отклонение. * — достоверность различий ($p < 0.05$) с группой со стандартной диетой; # — достоверность различий ($p < 0.05$) с группой молодых мышей; @ — достоверность различий ($p < 0.05$) с контролем.

держание изоформы альфа 1 Na⁺/K⁺-АТФазы в мышечной ткани увеличивалось, если нагрузка применялась в светлую или темную фазу, но не в переменном режиме. Однако это увеличение было менее выражено, чем у молодых животных. В целом на фоне принудительных беговых нагрузок содержание изоформы альфа 1 Na⁺/K⁺-АТФазы в мышечной ткани мышей с моделью СД увеличивалось у молодых животных — при применении нагрузок в переменном режиме, у возрастных — в темную фазу.

На рис. 3 представлено содержание изоформы альфа 2 Na⁺/K⁺-АТФазы в мышечной ткани экспериментальных животных. Результаты представлены в процентах от контроля, за 100% принято содержание данного белка в мышечной ткани молодых мышей, находящихся на стандартной диете и не подвергавшихся принудительному бегу.

Как видно из рис. 3а, жировая диета у молодых животных способствует некоторому снижению содержания изоформы альфа 2 Na⁺/K⁺-АТФазы в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки не влияли на содержание данного белка у молодых животных, получавших стандартную диету. В то же время у животных, получавших жировую диету, принудительные беговые нагрузки способствовали снижению содержания изоформы альфа 2 Na⁺/K⁺-АТФазы в мышечной ткани, если нагрузка применялась в светлую фазу или в переменном режиме. Применение нагрузки в темную фазу не оказывало эффекта на содержание данного фермента у молодых животных.

Как видно из рис. 3б, у возрастных животных контрольной группы содержание изоформы альфа 2 Na⁺/K⁺-АТФазы в мышечной ткани было вдвое ниже по сравнению с молодыми животными. При этом питание жировой диетой у возрастных животных не влияло на содержание данного фермента в мышечной ткани.

Принудительные беговые нагрузки способствовали увеличению содержания изоформы альфа 2 Na⁺/K⁺-АТФазы в мышечной ткани у возрастных животных. Этот эффект был выражен как у животных, получавших стандартную диету (если

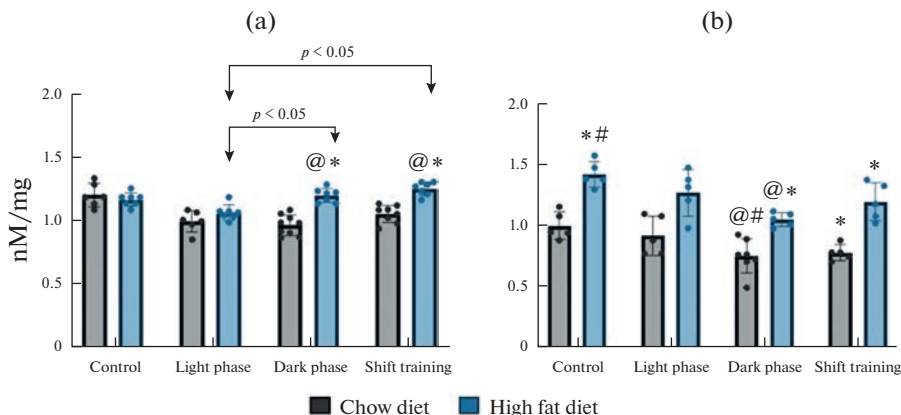


Рис. 4. Концентрация Na^+ в мышечной ткани мышей (нМ/мг белка). Панель (a) – молодые мыши; панель (b) – возрастные мыши. Данные представлены как среднее $\pm$ среднее квадратичное отклонение. * – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой со стандартной диетой; # – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой молодых мышей; @ – достоверность различий ($p < 0.05$) с контролем.

нагрузки применялись в светлую или темную фазу, но не в переменном режиме), так и у животных, получавших жировую диету (во всех режимах применения нагрузок, но в наибольшей степени – в светлую фазу). В целом на фоне принудительных беговых нагрузок у животных, получавших жировую диету, содержание изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани возрастных мышей было заметно выше, чем у молодых.

Во второй части работы концентрация катионов натрия и калия в мышечной ткани определялась методом атомной абсорбционной спектроскопии.

На рис. 4 представлена концентрация катионов натрия в мышечной ткани экспериментальных животных. Результаты представлены в нМ/мг белка.

Как видно из рис. 4a, жировая диета у молодых животных не влияет на концентрацию ионов натрия в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки также достоверно не повлияли на этот показатель ни в одной группе мышей, получавших стандартную диету. Небольшое увеличение концентрации натрия в группе молодых мышей, получавших жировую диету, было отмечено при принудительных беговых нагрузках в темную фазу и при попеременном режиме.

Как видно из рис. 4b, жировая диета у возрастных животных способствовала увеличению концентрации ионов натрия в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки приводили к снижению данного показателя, если применялись в темную фазу или в переменном режиме.

На рис. 5 представлена концентрация катионов калия в мышечной ткани экспериментальных животных. Результаты представлены в нМ/мг белка.

Как видно из рис. 5a, жировая диета у молодых животных способствует увеличению концентрации ионов калия в мышечной ткани. Принудительные беговые нагрузки приводили к возрастанию концентрации ионов калия в группах мышей, получавших стандартную диету, если нагрузка выполнялась в светлую или темную фазу. У мышей, получавших жировую диету, изменений со стороны концентрации ионов калия в мышечной ткани под влиянием нагрузок мы не зафиксировали.

Как видно из рис. 5b, жировая диета у возрастных животных способствовала значительному увеличению концентрации ионов калия в мышечной ткани. При-

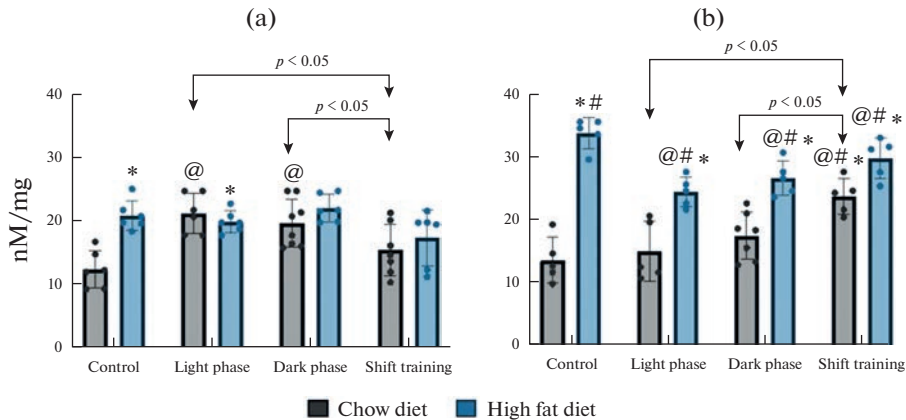


Рис. 5. Концентрация K^+ в мышечной ткани мышей (нМ/мг белка). Панель (a) – молодые мыши; панель (b) – возрастные мыши. Данные представлены как среднее $\pm$ среднее квадратичное отклонение. * – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой со стандартной диетой; # – достоверность различий ($p < 0.05$) с группой молодых мышей; @ – достоверность различий ($p < 0.05$) с контролем.

нудительные беговые нагрузки приводили к снижению данного показателя независимо от схемы их применения. У животных, получавших стандартную диету, концентрация ионов калия в мышечной ткани не изменялась под влиянием физических нагрузок.

В заключение можно отметить, что у молодых животных с моделью СД изменения концентраций одновалентных катионов натрия и калия после принудительных беговых нагрузок были выражены в меньшей степени. У возрастных мышей с моделью СД на фоне принудительных нагрузок наблюдалось возрастание содержания натрия и снижение содержания калия в мышечной ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подводя итог сказанному, следует отметить, что формирование метаболических расстройств, аналогичных СД II, у мышей сопровождается изменением содержания изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани *m. gastrocnemius*. У молодых животных отмечается увеличение, у возрастных – напротив, снижение. Содержание изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани *m. gastrocnemius* снижается при формировании СД II у молодых мышей. Эффект принудительных беговых нагрузок на содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани *m. gastrocnemius* выражен значительно и прежде всего различается в возрастных группах. У молодых животных отмечается увеличение содержания изоформы альфа 1 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани *m. gastrocnemius* и снижение содержания изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в сравнении с величинами до применения беговых нагрузок. У возрастных животных отмечается увеличение содержания изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани *m. gastrocnemius* в сравнении с величинами до применения беговых нагрузок.

Полученные результаты, особенно в группе молодых животных, вступают в некоторое противоречие с литературными данными. В частности, Clausen [34] утверждает, что исследования изоформы альфа 2 субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы выявили относительное увеличение ее количества в ответ на физическую нагрузку и прием глю-

кортикоида дексаметазона. Можно предполагать, что в наших экспериментах физические нагрузки применялись в течение длительного времени (4 недели), что приводило к адаптивным изменениям. Также можно отметить определенную зависимость влияния принудительных беговых нагрузок на содержание данного фермента от времени их применения. В большей степени оказывают эффект нагрузки, применяемые в период сна (в светлую фазу дня), а также при чередовании фаз.

Описанные изменения содержания основного фермента, транспортирующего одновалентные катионы через клеточную мембрану, могут являться одной из причин изменения концентрации натрия и калия в мышечной ткани. У молодых животных абсолютные изменения этих концентраций после принудительных беговых нагрузок были выражены в меньшей степени, но изменение их соотношения было более значительным. У возрастных мышей на фоне принудительных нагрузок наблюдалось возрастание содержания натрия и калия в мышечной ткани, но соотношение концентраций изменялось незначительно.

Обнаруженные изменения обмена одновалентных катионов в мышечной ткани мышей при СД II под влиянием принудительных беговых нагрузок могут играть роль в реализации метаболических эффектов физической активности. Они могут быть связаны с особенностями $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -зависимых путей внутриклеточной сигнализации. Модификация этих механизмов под влиянием метаболических расстройств и физических нагрузок представляет значительный интерес, так как является перспективным путем воздействия на процессы метаболизма как на клеточном, так и на системном уровне, что весьма актуально для поиска новых путей коррекции метаболических расстройств при СД II.

Полученные результаты дают основания рассматривать систему одновалентных катионов как один из вариантов возможных механизмов влияния физической активности на резистентность мышечной ткани к инсулину при СД II. Данный механизм может быть связан с особенностями регуляции процессов транскрипции. Показано, что транскрипционные изменения при сокращении мышц наиболее выражены в быстро сокращающихся мышечных волокнах типа IIa [35], доля которых у больных СД II увеличивается.

Возбуждение миоцитов сопровождается изменением трансмембранного градиента одновалентных катионов вследствие притока Na^+ и оттока K^+ через потенциал-зависимые и Ca^{2+} -чувствительные ионные каналы. В мышечных клетках человека и экспериментальных животных длительные упражнения приводят к увеличению $[Na^+]_i$ в 3–4 раза и снижению $[K^+]_i$ на 50%, что сопровождается повышением $[K^+]_i$ в плазме и межклеточной жидкости [36]. Это позволяет предположить, что изменение концентрации $[Na^+]_i$ и $[K^+]_i$ может являться фактором, регулирующим метаболические перестройки в мышечных волокнах, в том числе, способность утилизировать глюкозу [30, 31]. В некоторых типах клеток повышение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ приводило к экспрессии mRNA целого ряда регуляторных молекул [37].

ВЫВОДЫ

1. Формирование СД II у мышей сопровождается изменением содержания изоформ альфа 1 и 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани. Эффект принудительных беговых нагрузок на содержание изоформ Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани выражен значительно и различается в возрастных группах. На фоне принудительных беговых нагрузок у животных, получавших жировую диету, содержание изоформы альфа 2 Na^+/K^+ -АТФазы в мышечной ткани возрастных мышей было заметно выше, чем у молодых.

2. Обнаружена зависимость влияния принудительных беговых нагрузок на содержание данного фермента от времени их применения. У молодых животных принудительные беговые нагрузки способствовали снижению содержания изоформы альфа $2\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в мышечной ткани, если нагрузка применялась в светлую фазу или в переменном режиме. У возрастных животных эффект регистрировался при всех режимах применения нагрузок, но в наибольшей степени — в светлую фазу.

3. У молодых животных с моделью СД изменения концентраций одновалентных катионов натрия и калия после принудительных беговых нагрузок были выражены в меньшей степени. У возрастных мышей с моделью СД на фоне принудительных нагрузок наблюдалось возрастание содержания натрия и снижение содержания калия в мышечной ткани.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комиссии по биоэтике Биологического института Томского государственного университета (протокол № 32 от 02.12.2019 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-15-00118, <https://rscf.ru/project/19-15-00118-p>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (З.А.Н., Ч.А.В. и К.Л.В.), сбор данных (К.О.В., О.А.А., Ш.И.Ю. и К.Ю.Г.), обработка данных (З.А.Н., М.К.Г., Д.Е.Ю.), написание и редактирование статьи (З.А.Н., М.К.Г. и К.Л.В.), одобрение финальной версии статьи, подлежащей публикации (Ч.А.В. и К.Л.В.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Groop LC, Eriksson JG* (1992) The etiology and pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes. *Ann Med* 24(6): 483–489.
<https://doi.org/10.1002/dmr.5610090503>
2. *Fujimaki S, Kuwabara T* (2017) Diabetes-induced dysfunction of mitochondria and stem cells in skeletal muscle and the nervous system. *Int J Mol Sci* 18(10): 2147.
<https://doi.org/10.3390/ijms18102147>
3. *Højlund K* (2014) Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. *Dan Med J* 61(7): B4890.
4. *Nagy C, Einwallner E* (2018) Study of In vivo glucose metabolism in high-fat diet-fed mice using oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT). *J Vis Exp* 7(131): 1–12.
<https://doi.org/10.3791/56672>
5. *Huh JY* (2018) The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism. *Arch Pharm Res* 41(1): 14–29.
<https://doi.org/10.1007/s12272-017-0994-y>
6. *Zakharova AN, Milovanova KG, Orlova, AA, Dyakova EY, Kalinnikova JG, Kollantay OV, Shuvalov IY, Chibalin AV, Kapilevich LV* (2023) Effects of Treadmill Running at Different Light Cy-

- cles in Mice with Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci* 24: 15132.
<https://doi.org/10.3390/ijms242015132>
7. *Winzell MS, Ahren B* (2004) The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53(3): S215–S219.
https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.s215
 8. *Meneilly GS* (2001) Pathophysiology of diabetes in the elderly. In: *Diabetes in old age*. John Wiley & Sons. 155–164.
<https://doi.org/10.1002/0470842326.ch2>
 9. *Brandt C, Pedersen BK* (2010) The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* 520258.
<https://doi.org/10.1155/2010/520258>
 10. *Hansen JS, Zhao X, Irmeler M, Liu X, Hoene M, Scheler M, Li Y, Beckers J, Hrab? de Angelis M, Häring HU, Pedersen BK, Lehmann R, Xu G, Plomgaard P, Weigert C* (2015) Type 2 diabetes alters metabolic and transcriptional signatures of glucose and amino acid metabolism during exercise and recovery. *Diabetologia* 58(8): 1845–1854.
<https://doi.org/10.1007/s00125-015-3584-x>
 11. *Karstoft K, Pedersen BK* (2016) Exercise and type 2 diabetes: focus on metabolism and inflammation. *Immunol Cell Biol* 94: 146–150.
<https://doi.org/10.1038/icb.2015.101>
 12. *Kapilevich L, Zakharova A, Kabachkova A, Kironenko T, Milovanova K, Orlov S* (2017) Different impact of physical activity on plasma myokines content in athletes and untrained volunteers. *FEBS J* 284(1): 370–373.
 13. *Kapilevich LV, Zakharova AN, Kabachkova AV, Kironenko TA, Orlov SN* (2017) Dynamic and static exercises differentially affect plasma cytokine content in elite endurance- and strength-trained athletes and untrained volunteers. *Front Physiol* 30(8): 35.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00035>
 14. *Jurkat-Rott K, Fauler M, Lehmann-Horn F* (2006) Ion channels and ion transporters of the transverse tubular system of skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 27: 275–290.
<https://doi.org/10.1007/s10974-006-9088-z>
 15. *Sejersted OM, Sjogaard G* (2000) Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol Rev* 80: 1411–1481.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1411>
 16. *McDonough AA, Thompson CB, Youn JH* (2002) Skeletal muscle regulates extracellular potassium. *Am J Physiol Ren Physiol* 282: F967–F974.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00360.2001>
 17. *McKenna MJ, Bangsbo J, Renaud JM* (2008) Muscle K^+ , Na^+ , and Cl^- -disturbances and Na^+ - K^+ pump inactivation: implications for fatigue. *J Appl Phys* 104: 288–295.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01037.2007>
 18. *Murphy KT, Nielsen OB, Clausen T* (2008) Analysis of exercise-induced Na^+ - K^+ exchange in rat skeletal muscle. *Exp Physiol* 93: 1249–1262.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.042457>
 19. *Cairns SP, Lindinger MI* (2008) Do multiple ionic interactions contribute to skeletal muscle fatigue? *J Physiol* 586: 4039–4054.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.155424>
 20. *Orlov SN, Koltsova SV, Kapilevich LV, Gusakova SV, Dulin NO* (2015) KCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension. *Genes & Diseases* 2: 186–196.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.02.007>
 21. *Smolyaninova LV, Koltsova SV, Sidorenko SV, Orlov SN* (2017) Augmented gene expression triggered by Na^+ , K^+ -ATPase inhibition: Role of Ca_i^{2+} -mediated and – independent excitation-transcription coupling. *Cell Calcium* 68: 5–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.10.002>
 22. *Sidorenko S, Klimanova E, Milovanova K, Lopina OD, Kapilevich LV, Chibalin AV, Orlov SN* (2018) Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: Role of Ca_i^{2+} -mediated and Ca_i^{2+} -independent signaling and elevated $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio. *Cell Calcium* 76: 72–86.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.09.007>
 23. *Kapilevich LV, Kironenko TA, Zakharova AN* (2015) Skeletal muscle as an endocrine organ: role of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling. *Genes & Diseases* 2: 328–336.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.10.001>
 24. *Lauritzen HP, Brandauer J, Schjerling P* (2013) Contraction and AICAR stimulate IL-6 vesicle depletion from skeletal muscle fibers *in vivo*. *Diabetes* 62: 3081–3092.
<https://doi.org/10.2337/db12-1261>

25. Jannot MF, Dufayet De La Tour DT, Coste P (2002) Na/K ATPase activity in Diabetic Patient Metabolism. *Diabetes mellitus* 51(3): 284–291.
26. Shamansurova ZM, Mukhamedova FA, Tsoi AG, Tashmanova AB, Alieva AV, Akhrarova NA (2009) Abnormal Na-K-ATPase activity in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Diabetes mellitus* 12(2): 55–57.
<https://doi.org/10.14341/2072-0351-5399>
27. Chistyakova OV, Sukhov IB, Dobretsov MG, Kubasov IV (2020) Study of Na/K-ATPase activity in the myocardium of rats under experimental conditions of prediabetes and diabetes mellitus. *J Evol Biochem Physiol* 56(2): 166–168.
<https://doi.org/10.1134/S0022093020020118>
28. Kapilevich LV, Milovanova KG, Sidorenko SV, Fedorov DA, Kironenko TA, Zakharova AN, Dyakova EYu, Orlov SN (2020) Influence of dynamic and static loads on the content of sodium and potassium in mouse skeletal muscles. *Bull Exp Biol Med* 169(1): 4–7.
<https://doi.org/10.1007/s10517-020-04811-y>
29. Klimanova EA, Sidorenko SV, Tverskoi AM, Shiyan AA, Smolyaninova LV, Kapilevich LV, Guskova SV, Maksimov GV, Lopina OD, Orlov SN (2019) Search for Intracellular Sensors Involved in the Functioning of Monovalent Cations as Secondary Messengers. *Biochemistry (Moscow)* 84(11): 1280–1295.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919110063>
30. Shiyan AA, Sidorenko SV, Fedorov D, Klimanova EA, Smolyaninova LV, Kapilevich LV, Grygorczyk R, Orlov SN (2019) Elevation of intracellular Na⁺ contributes to expression of early response genes triggered by endothelial cell shrinkage. *Cell Physiol Biochem* 53(4): 638–647.
<https://doi.org/10.33594/000000162>
31. Smolyaninova LV, Shiyan AA, Kapilevich LV, Lopachev AV, Fedorova TN, Klementieva TS, Moskovtsev AA, Kubatiev AA, Orlov SN (2019) Transcriptomic changes triggered by ouabain in rat cerebellum granule cells: Role of α 3- and α 1-Na⁺, K⁺-ATPase-mediated signaling. *PLoS One* 14(9): e0222767.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222767>
32. Kapilevich LV, Zakharova AN, Dyakova EYu, Kalinnikova JG, Chibalin AV (2019) Mice experimental model of diabetes mellitus type ii based on high fat diet. *Bull Siber Med* 18(3): 53–61.
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-53-61>
33. Zakharova AN, Kalinnikova Y, Negodenko ES, Orlova AA, Kapilevich LV (2020) Experimental simulation of cyclic training loads. *Teor Prakt Fizich Kult* 10: 26–27.
34. Clausen T (2013) Quantification of Na, K pumps and their transport rate in skeletal muscle: Functional significance. *J General Physiol* 142(4): 327–345.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201310980>
35. Raue U, Trappe TA, Estrem ST, Qian H-R, Helvering LM, Smith RC, Trappe S (2012) Transcriptomic signature of resistance exercise adaptations: mixed muscle and fiber type specific profiles in young and old adults. *J Appl Physiol* 112: 1625–1636.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00435.2011>
36. McKenna MJ, Bangsbo J, Renaud JM (2008) Muscle K⁺, Na⁺, and Cl[−] disturbances and Na⁺-K⁺ pump inactivation: implications for fatigue. *J Appl Phys* 104: 288–295.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01037.2007>
37. Koltsova SV, Trushina Y, Haloui M, Akimova OA, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN (2012) Ubiquitous [Na⁺]_i/[K⁺]_i-sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for [Ca²⁺]_i-independent excitation-transcription coupling. *PLoS One* 7: e38032.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038032>

**Influence of Forced Running Loads on the Content
of Na⁺/K⁺-ATPase Isoforms and Monovalent Cations in Skeletal Muscles
of Mice with a Model of Type II Diabetes Mellitus**

**A. N. Zakharova^a, K. G. Milovanova^a, A. A. Orlova^a, E. Yu. Dyakova^a, Yu. G. Kalinnikova^a,
O. V. Kollantay^a, I. Yu. Shuvalov^a, A. V. Chibalin^a, and L. V. Kapilevich^a, ***

^aNational Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

*e-mail: kapil@yandex.ru

The effect of forced running for 1 hour daily for 4 weeks on the content of Na⁺/K⁺-ATPase isoforms and monovalent cations in the skeletal muscles of mice with a model of type II diabetes mellitus (DM-II) was studied. To form a model of the disease, a high-fat diet was used, and physical activity in the form of forced running was carried out for 4 weeks. The content of Na⁺/K⁺-ATPase isoforms and Na⁺ and K⁺ ions in muscle tissue of

m. gastrocnemius was determined by Western blotting and atomic absorption spectrophotometry, respectively. It has been shown that the formation of DM-II in mice is accompanied by changes in the content of Na^+/K^+ -ATPase alpha 1 and 2 isoforms in muscle tissue. The effect of forced running loads on the content of Na^+/K^+ -ATPase in muscle tissue is significant and primarily differs in age groups. One can also note a certain dependence of the influence of forced running loads on the content of this enzyme on the time of their use. In young animals, changes in the concentrations of monovalent sodium and potassium cations after forced running loads were less pronounced. In aged mice, against the background of forced loads, an increase in the content of sodium and decrease in the content of potassium in muscle tissue was observed. The detected changes in monovalent cations content in the muscle tissue of mice with diabetes mellitus II under the influence of forced running loads may play a role in the implementation of the metabolic effects of physical activity.

Keywords: monovalent cations, Na^+/K^+ -ATPase, muscles, running load, diabetes mellitus

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ПОТЕНЦИАЛЫ, СВЯЗАННЫЕ С СОБЫТИЯМИ, В Go/NoGo ТЕСТЕ
КАК ВОЗМОЖНЫЕ НЕЙРОМАРКЕРЫ МОНОТОНИИ**

© 2023 г. М. В. Пронина^{1, *}, М. Г. Старченко¹, Ю. А. Бойцова¹, А. А. Богдан¹,
Ю. Г. Хоменко¹, Г. В. Катаева¹, Ю. А. Шичкина¹, Ю. Д. Кропотов¹

¹Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет “ЛЭТИ”,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: marina.v.pronina@gmail.com

Поступила в редакцию 01.09.2023 г.

После доработки 15.10.2023 г.

Принята к публикации 16.10.2023 г.

Монотония возникает при выполнении малосодержательной и однообразной работы, в том числе, работы оператора. Она сопровождается снижением концентрации внимания и скорости его переключения, замедлением процессов восприятия и двигательных реакций, что может привести к потере бдительности, самоконтроля и возникновению сонливости и, следовательно, повышению рисков производственных травм и аварий. В связи с этим актуальной задачей является разработка методов мониторинга состояния человека в процессе выполнения монотонной деятельности. В работе исследовалось влияние монотонии на волны потенциалов, связанных с событиями (ПСС), в Go/NoGo тесте с предупреждающим стимулом. Анализировались данные 31-канальной ЭЭГ 25 здоровых испытуемых, зарегистрированной до и после выполнения четырех зрительных тестов общей продолжительностью около 1.5 ч, представляющих собой однотипные задания с различными инструкциями и моделирующих условия монотонной работы. После выполнения четырех тестов было обнаружено повышение волны P2, снижение волн P3 Cue и условного негативного отклонения (УНО; волна ожидания), регистрируемых после предъявления предупреждающего стимула, а также снижение волны P300, наблюдаемой после предъявления NoGo стимула. Результаты, полученные в данной работе, по-видимому, отражают ослабление проактивного и реактивного когнитивного контроля при монотонии и позволяют рассматривать волны P2, P3 Cue, P3 NoGo и волну ожидания как возможные кандидаты на роль нейромаркеров монотонии, что делает перспективным использование этих показателей в системах мониторинга состояния человека во время выполнения операторской работы.

Ключевые слова: потенциалы, связанные с событиями, Go/NoGo тест, монотония, когнитивный контроль, волна P300, волна P2, условное негативное отклонение

DOI: 10.31857/S0869813923120087, EDN: CHYXXJ

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире в связи с развитием автоматизации всех сфер производства остро встает проблема мониторинга эмоционального и когнитивного состояния человека-оператора для предотвращения производственных травм и аварий. Особую опасность представляет собой такое функциональное состояние, как монотония. Она возникает при выполнении монотонной, то есть однообразной и малосо-

держательной работы, при которой одни и те же действия повторяются с определенной цикличностью. При монотонии снижается сознательный контроль за выполнением деятельности [1]. Принято выделять двигательную монотонию, вызванную повторением однообразных действий, и сенсорную, связанную с однообразием поступающих сигналов. Эмоционально монотония может переживаться человеком как скука, апатия, усталость, безразличие к выполняемой работе или нежелание выполнять ее. С точки зрения когнитивных функций наблюдается снижение концентрации внимания и скорости его переключения, замедление процессов восприятия и двигательных реакций, что может привести к потере бдительности, самоконтроля и возникновению сонливости (дремотного состояния) и, следовательно, повышению рисков производственных травм и аварий. В связи с этим поиск объективных физиологических маркеров состояния монотонии по-прежнему остается высокоактуальной задачей.

Поскольку монотонная работа, как и всякая другая, вызывает усталость и утомление, существует две точки зрения на эту проблему. Отечественные ученые в основном рассматривают монотонию и утомление как разные функциональные состояния. Их отличие состоит в том, что утомление возникает, главным образом, при тяжелой работе, или, если речь идет об умственном утомлении, то при интенсивной интеллектуальной деятельности, связанной с большим потоком информации и временными ограничениями на выполнение деятельности, а монотония может возникать и при выполнении легкой, неустойчивой работы. При прекращении однообразной работы монотония исчезает, тогда как для исчезновения утомления просто прекращения работы недостаточно, требуется отдых. Зарубежные авторы склонны рассматривать монотонию как разновидность утомления, в первую очередь, умственного [2]. Различают активное умственное утомление, вызванное высокими требованиями деятельности и перегрузкой, и пассивное — собственно монотонию [3, 4].

Значительная часть исследований нейрофизиологических коррелятов состояния монотонии выполнена с помощью ЭЭГ, но их результаты неоднозначны. Корреляты монотонии связывают с большим количеством ритмов. Так, показана связь монотонии с повышением мощности альфа-ритма [5–7], повышением мощности тета-ритма [7] и снижением мощности бета-ритма [8, 9]. Однако в других исследованиях показано существование специфического ЭЭГ-паттерна монотонии, характеризующегося одновременным повышением мощности тета-, альфа- и бета-ритмов [10, 11], который интерпретируется как наличие двух противоположных тенденций — снижение функциональной активности областей коры, которые не участвуют в выполнении текущей задачи, и одновременно поддержание активности тех мозговых областей, которые вовлечены в реализацию деятельности.

Снижение концентрации внимания и скорости его переключения, замедление скорости процессов восприятия и двигательных реакций, наблюдаемые при развитии монотонии или утомления, могут быть следствием ухудшения работы мозговой системы когнитивного контроля, которая регулирует и координирует целенаправленное поведение для обеспечения адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды [12]. В частности, эта система обеспечивает такие операции, как селекцию, планирование и подавление действий, детекцию конфликта между возможными вариантами действий и подстройку дальнейшего поведения для избегания конфликтов [13]. С точки зрения поиска нейрофизиологических маркеров, потенциалы, связанные с событиями (ПСС), могут являться более перспективным инструментом для выявления состояния монотонии, чем ЭЭГ, поскольку по данным предыдущих исследований они позволяют оценить работу процессов системы когнитивного контроля [13, 14].

Модель дуальных механизмов когнитивного контроля [15] предполагает, что когнитивный контроль реализуется в двух разнесенных во времени процессах: проактивном и реактивном, между которыми человек может переключаться. Проактивный контроль обеспечивает поддержание целей, связанных с задачей, до предъявления стимулов, требующих реакции, и включает в себя такие гипотетические операции, как постановка задачи, ориентирование на стимул и задействование рабочей памяти [14]. Предполагается, что эти процессы отражаются в специфических волнах ПСС, таких как лобно-центральная волна N2 [16], условное негативное отклонение (УНО), или волна ожидания [17], и волна P3 Cue [18]. Реактивный контроль отвечает за реализацию или торможение подготовленного действия после предъявления ожидаемого стимула в зависимости от задачи, и включает в себя гипотетические операции активации связи стимул–реакция [19] подавления или переопределение двигательной программы [20] и обнаружения конфликта между возможными действиями [21]. Эти процессы предположительно отражаются в волнах ПСС P250, P3 Go, P3 NoGo и N2 [14].

Для создания условий, в которых задействуются процессы когнитивного контроля, широко используются тесты Go/NoGo парадигмы, в которых от испытуемых требуется как можно быстрее и точнее реагировать, например, нажатием на кнопку, на определенные стимулы (Go условие) и воздерживаться от ответа на другие (NoGo условие). Для оценки процессов проактивного контроля используются в том числе Go/NoGo тесты с предупреждающим стимулом, который с определенной долей вероятности указывает на то, что следующий стимул будет целевым. В таком случае проактивный контроль задействуется в интервале между предупреждающим и императивным стимулами, а реактивный – после предъявления императивного стимула. Предыдущие психофизиологические исследования показывают связь волн ПСС, зарегистрированных при выполнении подобных тестов, с гипотетическими операциями проактивного и реактивного когнитивного контроля [14].

В немногочисленных работах, исследующих состояние монотонии с помощью метода ПСС, было найдено снижение амплитуды волны ожидания [22, 23] и волны P300 [24, 25], а также увеличение латентности P300 [26]. Однако в других работах изменений амплитуды P300 после выполнения утомляющих тестов обнаружено не было [22, 27], поэтому поиск нейрофизиологических маркеров монотонии по-прежнему остается актуальной задачей.

Целью исследования было выявление изменений волн ПСС, отражающих процессы когнитивного контроля и регистрируемых в зрительном Go/NoGo тесте с предупреждающим стимулом, при развитии монотонии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Испытуемые

В работе анализировались данные 25 здоровых испытуемых в возрасте от 19 до 25 лет, 17 мужчин, все участники исследования являлись студентами Санкт-Петербургского государственного электротехнического университета “ЛЭТИ”, не имели черепно-мозговых травм в анамнезе, психических, неврологических, онкологических и нейродегенеративных заболеваний, алкогольной и наркотической зависимости, не принимали психотропные препараты.

Психологическое тестирование

В батарею методик психологического тестирования вошли следующие методики: опросники “Самочувствие–Активность–Настроение” (САН), “Актуальное со-

стояние” (АС), “Утомление—Пресыщение—Монотония—Стресс” (УПМС) и корректурная проба.

Опросник САН позволяет провести экспресс-оценку состояния индивида по трем шкалам самочувствия, активности и настроения испытуемого. Опросник состоит из 30 пар противоположных характеристик, по которым испытуемого просят оценить свое состояние. После подсчета баллов по каждой шкале результаты интерпретируются следующим образом: оценки ниже 4 баллов рассматриваются как неблагоприятное состояние испытуемого по соответствующей шкале, оценки, превышающие 4 балла, свидетельствуют о благоприятном состоянии испытуемого. В норме оценки состояния располагаются в диапазоне 5.0–5.5 баллов.

Опросник АС описывает уровень актуального психического состояния и те его особенности, которые могут быть обусловлены влиянием конкретных событий текущего момента (например, экзамен, долгое ожидание, плохое физическое самочувствие и т.д.). Опросник состоит из 38 утверждений, описывающих признаки, характеризующие актуальное состояние человека, группирующиеся в 5 шкал: 1) шкала “Ак”: “активация—деактивация”, 2) шкала “То”: “тонус: высокий—низкий”, 3) шкала “Са”: “самочувствие физическое: комфортное—дискомфортное”, 4) шкала “Сп”: “спокойствие—тревога”, 5) шкала “Во”: “возбуждение эмоциональное: низкое—высокое”. При подсчете баллов по каждой шкале они переводятся в стандартные Т-баллы и далее интерпретируются следующим образом: 55 и более Т-баллов — это повышенные оценки по той или иной шкале, 45 и менее Т-баллов — пониженные оценки.

Опросник УПМС оценивает выраженность 4 компонентов функционального состояния — утомления, пресыщения, монотонии и стресса — и состоит из 40 утверждений. После подсчета баллов по каждому компоненту они интерпретируются следующим образом — менее 18 баллов — означает невыраженность данного компонента, от 18 до 29 баллов — выраженность компонента, а более 30 баллов — сильная степень выраженности того или иного компонента.

Корректурная проба является широко используемой методикой для оценки целого ряда показателей, в частности, оценки функций системы внимания, а также для выявления признаков утомляемости. Корректурная проба в буквенном варианте проводилась в течение 5 мин, каждые 30 с испытуемый отмечал то место на бланке, где он работал в данный момент. Задачей для испытуемого было зачеркивать букву А и подчеркивать букву И. Подсчитывались следующие показатели — количество ошибок, пропусков и концентрация внимания.

Опросники САН, АС и корректурная проба предлагались испытуемым дважды — перед началом нейрофизиологического исследования и после его окончания. Опросник УПМС давался один раз — после окончания нейрофизиологического исследования. Также перед началом нейрофизиологического исследования, после выполнения каждого теста Go/NoGo и после окончания исследования оценивалась степень субъективного утомления испытуемого по шкале от 1 до 10, где 1 балл — отсутствие усталости, а 10 — максимальная степень усталости.

Тестовое задание

Все испытуемые в одном и том же порядке выполняли шесть вариантов двустимульного зрительного теста в парадигме Go/NoGo (рис. 1). Было предположено, что выполнение в течение достаточно длительного времени тестов, требующих постоянного внимания к предъявляемым стимулам и совершения определенных действий в ответ на них, может рассматриваться как модель условий монотонной работы оператора.

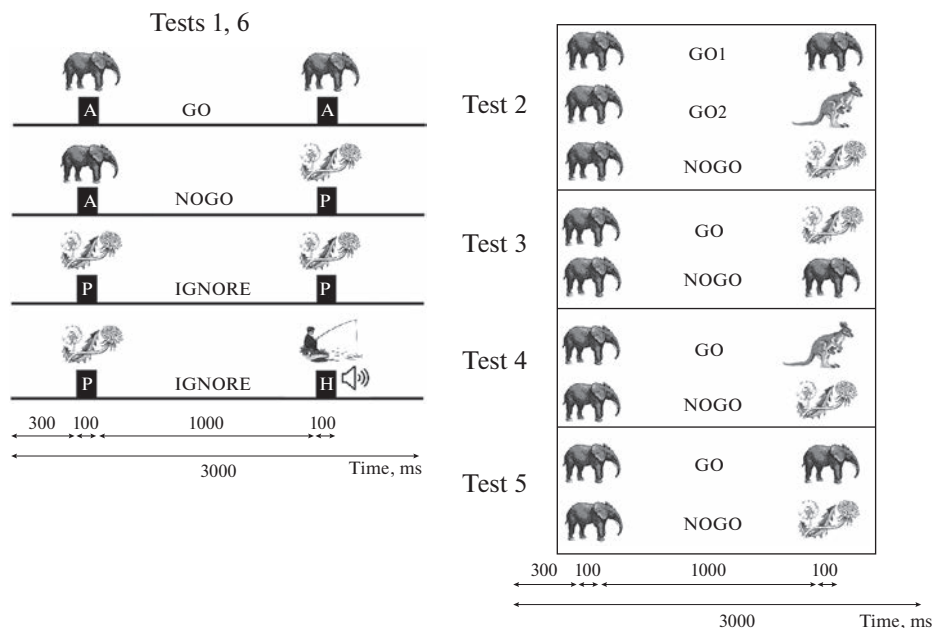


Рис. 1. Схема предъявления стимулов в Тестах 1–6. А (animal) – изображение животного, Р (plant) – изображение растения, Н (human) – изображение человека.

Первый и последний тесты в последовательности (Тест 1 и Тест 6) были идентичны и состояли из 400 проб, общей продолжительностью около 20 мин. Пробами являлись пары изображений в следующих сочетаниях: “животное–животное” (проба Go), “животное–растение” (проба NoGo), “растение–растение” (проба Ignore) и “растение–человек” (проба Novel). В пробах “животное–животное” и “растение–растение” первое и второе изображения были полностью идентичны. Одновременно с изображением человека предъявлялся звуковой сигнал со звуковым давлением около 70 дБ у головы испытуемого, представлявшим собой комбинацию тонов частотой 5000, 2500, 2000, 1500 и 1000 Гц в случайном порядке. Каждый тон длился 20 мс, суммарная длительность звукового сигнала составляла 100 мс. Изображения животных, растений и людей предъявлялись на экране ноутбука, слуховые стимулы – через динамики.

Разные типы проб подавались в случайном порядке с вероятностью 25%. Соответственно вероятность предъявления изображения животного или растения в качестве предупреждающего стимула составляла 50%. В свою очередь, изображение животного в качестве предупреждающего стимула обозначало, что с вероятностью 50% за ним последует изображение животного, на которое нужно будет ответить нажатием на кнопку (проба Go), или, также с вероятностью 50%, следующим будет изображение растения, на которое нужно будет воздержаться от ответа (проба NoGo).

Длительность проб составляла 3000 мс, престаимпульный интервал – 300 мс, длительность каждого стимула – 100 мс, длительность интервала между двумя стимулами в паре – 1000 мс, интервал между парами стимулов 1800 мс.

Испытуемым давалась инструкция нажимать на левую кнопку мыши указательным пальцем правой руки как можно быстрее, в случае предъявления пары картинок “животное–животное” и не нажимать на предъявление других пар стимулов.

Звуки, предъявляемые вместе с изображениями человека, испытуемых просили игнорировать.

Тесты 2–5 были подобны Тесту 1, временная структура проб была идентична, но в качестве стимулов использовались только изображения животных и растений, предъявляемых парами, и инструкции для испытуемых были различны (рис. 1). Общая продолжительность выполнения Тестов 2–5 составляла примерно 1.5 ч.

Тест 2 состоял из 600 проб, общей продолжительностью около 30 мин. В качестве проб использовались следующие варианты пар изображений: “животное–животное” с двумя одинаковыми изображениями (проба Go1), “животное–животное” с двумя разными изображениями (проба Go2), “животное–растение” (проба NoGo), “растение–растение” с двумя одинаковыми изображениями, “растение–растение” с двумя разными изображениями и “растение–животное”. Пробы подавались в случайном порядке с вероятностью ~17%. Испытуемому давалось задание нажимать указательным пальцем правой руки на левую кнопку мыши как можно быстрее в случае предъявления пары “животное–животное” с одинаковыми изображениями, нажимать средним пальцем правой руки на правую кнопку мыши в случае предъявления пары картинок “животное–животное” с разными изображениями и не нажимать на предъявление других пар стимулов.

Тест 3 состоял из 400 проб, общей продолжительностью около 20 мин. В качестве проб использовались следующие комбинации стимулов: “животное–животное” (проба Go), “животное–растение” (проба NoGo), “растение–растение”, и “растение–животное”, в пробах “животное–животное” и “растение–растение” первое и второе изображения были полностью идентичны. Пробы подавались в случайном порядке с вероятностью 25%. Испытуемому давалась инструкция нажимать на кнопку указательным пальцем правой руки как можно быстрее в случае предъявления пары “животное–растение” и не нажимать на предъявление других пар стимулов.

Тест 4 состоял из 400 проб, общей продолжительностью около 20 мин. Пробами являлись пары зрительных стимулов: “животное–животное” (проба Go), “животное–растение” (проба NoGo), “растение–растение” и “растение–животное”, в пробах “животное–животное” и “растение–растение” первое и второе изображения всегда различались. Пробы подавались в случайном порядке с вероятностью 25%.

Задачей испытуемых было нажимать на левую кнопку мыши указательным пальцем правой руки как можно быстрее в случае предъявления пары картинок “животное–животное” и не нажимать на предъявление других пар стимулов.

Тест 5 по стимульному материалу был идентичен тесту 3. Испытуемому давалась инструкция нажимать на левую кнопку мыши указательным пальцем правой руки как можно быстрее в случае предъявления пары “животное–животное” и не нажимать на предъявление других пар стимулов.

В общем выполнение всех шести Go/NoGo тестов занимало примерно 2 ч 10 мин, не считая перерывов. До и после выполнения тестов у испытуемых регистрировали фоновую ЭЭГ в течение 4 мин с открытыми глазами и в течение 4 мин – с закрытыми.

Регистрация ЭЭГ

Для регистрации ЭЭГ использовался 32-канальный компьютерный электроэнцефалограф “Мицар-202” (CE 0537) производства ООО Мицар, (<http://www.mitsar-medical.com>) и электродный шлем МКС (производства ООО “Медицинские компьютерные системы”, Москва, Зеленоград) с 31 хлор-серебряным электродом, расположенным на поверхности головы в соответствии с неполной системой 10–10 в отведениях Fp_1 ; Fp_2 ; F_7 ; F_3 ; F_2 ; F_4 ; F_8 ; FT_7 ; FC_3 ; FC_2 ; FC_4 ; FT_8 ; T_3 ; C_3 ; C_2 ; C_4 ; T_4 ; TP_7 ; CP_3 ; CP_2 ; CP_4 ; TP_8 ; T_5 ; P_3 ; P_2 ; P_4 ; T_6 ; O_1 ; O_2 . Референтные электроды располагались на мочках ушей, а заземляющий – в лобной области. Место постановки

референтных электродов предварительно растирали абразивным гелем “Унискраб”. Пространство под электродами заполнялось небольшим количеством электропроводящего геля “Унимакс”, сопротивление электродов не превышало 5 кОм. ЭЭГ регистрировалась в монтаже с усредненным ушным референтом, частота оцифровки ЭЭГ составляла 250 Гц. Параметры ФВЧ и ФНЧ составляли 0.53 и 30 Гц соответственно, дополнительно использовался режекторный фильтр – 45–55 Гц. Для регистрации и анализа ЭЭГ использовалась программа WinEEG, стимулы предъявлялись с помощью программы Psytask.

Во время исследования испытуемый сидел в удобном кресле, перед ним на расстоянии 0.5 м располагался экран ноутбука. Для оценки правильности выполнения тестов и расчета времени реакции по отдельному каналу регистрировались сигналы от правой и левой кнопок мыши.

Расчет, сравнение и оценка психологических показателей, поведенческих характеристик (количество ошибок, время реакции, стандартная ошибка времени реакции) и ПСС проводилась в off-line режиме.

Обработка данных ЭЭГ

Коррекция артефактов движения глаз проводилась путем обнуления независимых компонент ЭЭГ, соответствующих вертикальным и горизонтальным движениям глаз согласно следующей процедуре: выбирался отрезок записи ЭЭГ, содержащий хорошо выраженные артефакты движений глаз, длительностью не менее 120 с и раскладывался на независимые компоненты с помощью алгоритма Infomax, как описано в [14].

Кроме того, из дальнейшего анализа исключались эпохи, содержащие высокоамплитудные артефакты. Считалось, что эпоха содержит артефакты, если в ней наблюдались: (1) потенциалы с амплитудой более 100 мкВ для всех отведений; (2) медленные волны в диапазоне от 0.53 до 1 Гц с амплитудой более 50 мкВ; (3) быстрые колебания сигнала в диапазоне от 20 до 35 Гц с амплитудой более 35 мкВ. Эти пороговые значения были подобраны эмпирически в результате многократного выполнения обработки с различными параметрами и последующего визуального анализа результатов [13, 14].

Также из анализа исключались пробы с ошибочными ответами, то есть пробы Go, после предъявления которых в интервале 100–1000 мс испытуемый не нажал на кнопку, и все остальные пробы, если в том же интервале было совершено нажатие. Количество ошибочных проб подсчитывалось и сравнивалось между первым и последним тестами.

Расчет ПСС производился отдельно для каждого типа проб, каждого испытуемого и каждого теста. Затем данные каждого испытуемого усреднялись для получения индивидуальных ПСС, которые далее сравнивались между Тестами 1 и 6. Анализ данных ПСС проводился в следующих временных интервалах:

- 1) 0–1100 мс после начала предъявления изображения животного в качестве предупреждающего стимула;
- 2) 0–600 мс после начала предъявления второго изображения животного в пробе Go (пара картинок животное–животное);
- 3) 0–600 мс после начала предъявления изображения растения в пробе NoGo (пара картинок животное–растение).

Статистический анализ

Поведенческие показатели – количество ошибок (пропусков и ложных нажатий), время реакции и его стандартная ошибка – сравнивались между 1-м и 6-м Тестами с помощью двустороннего критерия Вилкоксона. Поправка на множествен-

ность сравнений проводилась путем умножения значения p на количество сравниваемых параметров.

Для сравнительного анализа ПСС использовался основанный на кластерах анализ с перестановками [28], реализованный в программе WinEEG на основе инструментария FieldTrip MATLAB для анализа МЭГ/ЭЭГ (свободно доступного по адресу <http://fieldtrip.fcdonders.nl/>). В рамках этого метода на первом этапе выполнялось сравнение амплитуды волн потенциалов, связанных с событиями, зарегистрированных при выполнении Тестов 1 и 6, попарно для каждого условия теста, при этом для каждого канала и каждого временного отсчета в отдельности вычислялись значения статистик, полученных с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Затем различия со значениями p меньше критического ($p < 0.01$) группировались в кластеры на основе временной и пространственной близости. Наконец, для каждого из выделенных кластеров с помощью метода Монте-Карло вычислялись суммы величин указанных статистик. Затем исходные данные случайным образом перемешивались и снова выполнялся поиск кластеров уже для перемешанных данных. Перемешивание выполнялось путем перестановок меток проб, число перемешиваний — 10000. Далее для каждого кластера, наблюдаемого в исходных данных, вычислялась вероятность выделения кластеров в перемешанных данных с большей или равной суммой статистик. Эта вероятность принималась в качестве статистической значимости кластера.

Такой метод имеет ряд преимуществ по сравнению с другими используемыми подходами [28]. Он исключает необходимость субъективного выделения интервалов времени, в которых наблюдаются различия сигналов, позволяет решить проблему множественных сравнений, так как осуществляет их кластеризацию на основании временного и пространственного подобия, и наконец, выполняет статистические оценки, используя непараметрические критерии.

Поправка на множественность сравнений проводилась путем умножения значения p на количество выделенных кластеров, рассматривались кластеры со статистической значимостью $p < 0.05$ после применения поправки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Психологические показатели

При обработке данных психологического тестирования для каждого испытуемого подсчитывались показатели, полученные до и после проведения нейрофизиологического исследования по всем методикам, кроме УПМС. По данным корректурной пробы не выявлено ухудшения ее выполнения у большинства испытуемых после нейрофизиологического исследования — то есть, различий по количеству пропусков и ошибок и показателю концентрации внимания не отмечено. Психологические показатели по опроснику САН до начала проведения нейрофизиологического обследования находились в пределах нормальных значений у большинства испытуемых. Так, в опроснике САН по показателю “самочувствие” значения ниже нормы были выявлены у 4 испытуемых, по показателю “активность” — у 9 испытуемых, а по показателю “настроение” — у 5 испытуемых. По опроснику АС до начала проведения нейрофизиологического исследования у испытуемых наблюдался значительный разброс. Так, по шкале “Ак” средние значения (от 45 до 55 Т-баллов) наблюдались у 13 человек из группы, по шкале “То” — у 9 человек, по шкале “Са” — у 9 человек, по шкале “Сп” — у 4 человек, по шкале “Во” — у 9 человек. После проведения нейрофизиологического исследования у большей части испытуемых были выявлены различия, характеризующие ухудшение индивидуальных показателей по опросникам САН и АС и показателю чувства субъективной усталости. Далее для выявления статистической значимости отмеченных различий использо-

Таблица 1. Средние значения поведенческих показателей при выполнении Тестов 1 и 6

Тест	Пропуски	Ложные нажатия	Время реакции, мс	Стандартная ошибка времени реакции, мс
Тест 1	7.6	0.5	288	7.1*
Тест 6	12.3	1.4	297	9.3*

Звездочками отмечены значимые различия ($p < 0.05$) показателей между тестами.

вался двусторонний Т-критерий Вилкоксона. Статистически значимые различия ($p < 0.05$) были получены по следующим показателям:

- 1) показатели самочувствия, активности и настроения (по методике САН);
- 2) показатели по шкалам “активация—деактивация”, “самочувствие физическое — комфортное—дискомфортное”, “тонус — высокий — низкий” (по методике АС);
- 3) показатель субъективного чувства усталости.

По данным методики УПМС после проведения нейрофизиологического обследования у большинства испытуемых наблюдалась выраженность усталости (у 23 испытуемых), пресыщения (у 25 испытуемых) и монотонии (у 19 испытуемых), доходящая до высоких значений выраженности усталости (у 6 испытуемых), пресыщения (у 16 испытуемых) и монотонии (у 5 испытуемых).

Поведенческие показатели

Средние значения количества ошибок пропуска и ложных нажатий, а также среднее время реакции на Go стимулы в тестах 1 и 6 представлены в табл. 1. Было выявлено увеличение разброса (стандартной ошибки) времени реакции при ответе на пару “животное—животное” ($T = 57.5$, $p < 0.05$).

Потенциалы, связанные с событиями

Основанный на кластерах анализ волн ПСС, зарегистрированных после предъявления изображения животного в качестве предупреждающего стимула (первый стимул в пробах Go и NoGo), выявил три кластера, соответствующие волнам P2, P3 Cue и волне условного негативного отклонения.

Первый кластер наблюдался в интервале 152—232 мс после начала предъявления предупреждающего стимула в отведениях F_3 , F_z , F_4 , F_8 , FT_7 , FC_3 , FCZ , FC_4 , FT_8 , T_3 , C_3 , C_z , C_4 , T_4 , P_3 , P_z , P_4 . Амплитуда позитивной волны с максимумом топографии в теменно-затылочной области была увеличена ($p < 0.01$) в Тесте 6 (рис. 2, верхний ряд).

Второй кластер наблюдался в интервале 388—592 мс после начала предъявления предупреждающего стимула в отведениях F_z , F_4 , F_8 , FT_8 , T_3 , C_z , C_4 , T_4 , CP_3 , C_z , CP_4 , P_3 , P_z , P_4 . Амплитуда волны положительной полярности с максимумом топографии в теменной области была уменьшена ($p < 0.01$) в Тесте 6 (рис. 2, нижний ряд).

Третий кластер наблюдался в интервале 1016—1196 мс после начала предъявления предупреждающего стимула в отведениях C_z , C_4 , FC_4 , T_4 , TP_8 , TP_7 , P_3 , P_z , P_4 , T_6 , O_1 , O_z , O_2 . Амплитуда негативной волны с максимумом топографии в центральной области также была уменьшена ($p < 0.001$) в Тесте 6 (рис. 2, средний ряд).

Сравнительный анализ волн ПСС, зарегистрированных после предъявления второго стимула, выявил кластер, наблюдаемый в условии NoGo в интервале 320—440 мс в отведениях F_3 , F_z , F_4 , FC_3 , FC_z , FC_4 , FT_8 , C_3 , C_z , C_4 , T_4 , TP_7 , CP_3 , CP_z , CP_4 , TP_8 , T_5 , P_3 , P_z , P_4 , T_6 и соответствующий волне P3 NoGo. Волна имела максимум топографии в лобно-центральных отведениях, и ее амплитуда была уменьшена ($p < 0.001$) в Тесте 6 (рис. 3).

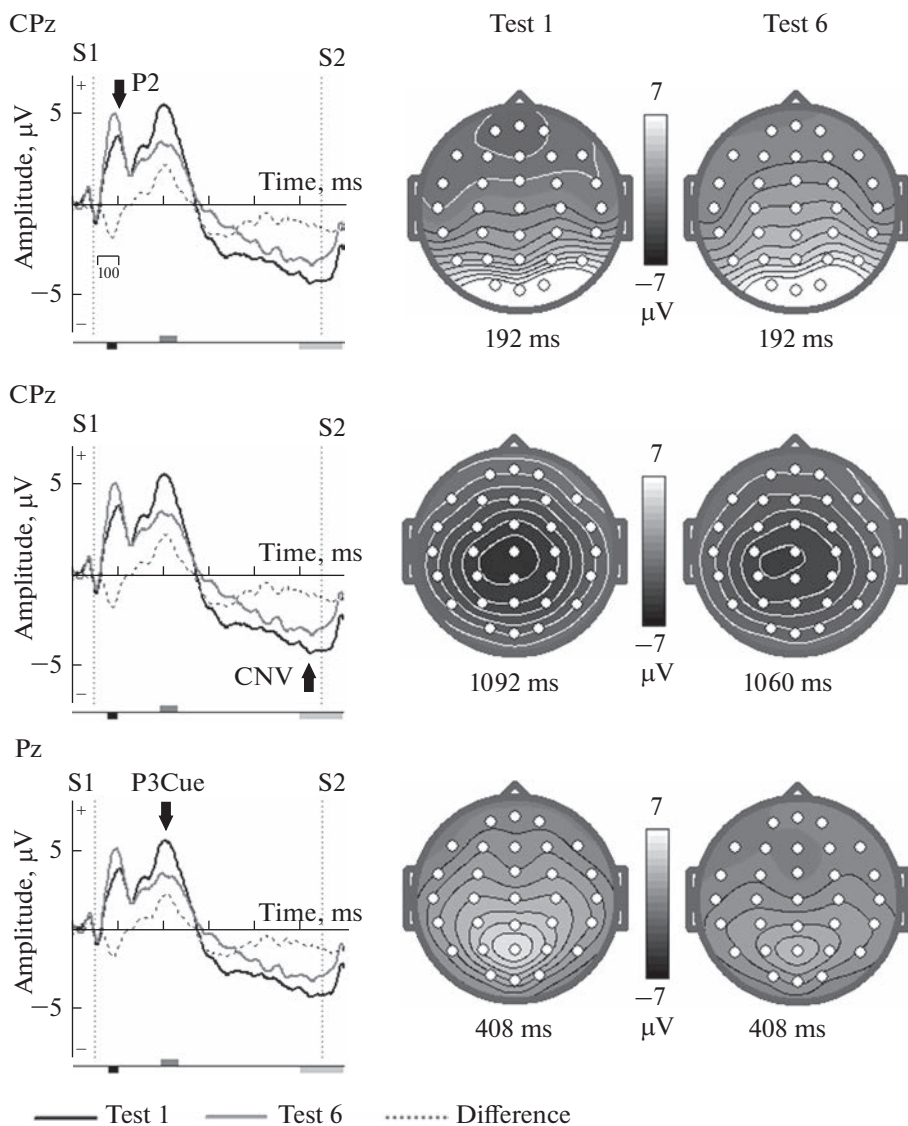


Рис. 2. Усредненные по группе испытуемых потенциалы, связанных с событиями, после предъявления предупреждающего стимула в Тестах 1 и 6, и топографии волн, различающихся между тестами. По оси X – время в мс, по оси Y – амплитуда в мкВ, вертикальная пунктирная линия – начало и конец предъявления стимулов (S1 и S2). Линия черного цвета – Тест 1, серая линия – Тест 6, пунктирная линия – разница. Гистограмма под графиком – кластеры, выделенные в результате статистического анализа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Психологические данные

По результатам психологического тестирования в целом по группе после проведения нейрофизиологического обследования можно говорить об ухудшении самочувствия и настроения, а также о снижении уровня активности испытуемых (по опроснику САН). Это подтверждается данными, полученными по опроснику АС:

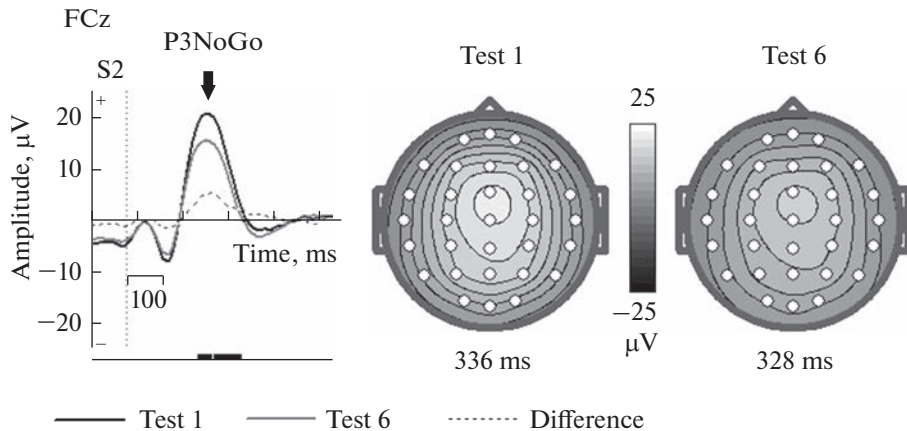


Рис. 3. Усредненные по группе испытуемых потенциалы, связанных с событиями, после предъявления NoGo стимула в Тестах 1 и 6, и топографии волны, различающейся между тестами. По оси X — время в мс, по оси Y — амплитуда в мкВ, вертикальная пунктирная линия — конец предъявления NoGo стимула. Линия черного цвета — Тест 1, серая линия — Тест 6, пунктирная линия — разница. Гистограмма под графиком — кластер, выделенный в результате статистического анализа.

наблюдается снижение оценок по шкале “Ак-АС”: “активация—деактивация”, что говорит об отсутствии мотивации к деятельности, безынициативному отношению к текущей ситуации; снижение оценок по шкале “То”: “тонус: высокий—низкий” свидетельствует о сниженной работоспособности, наличии утомления, инертности, заторможенности, ощущения вялости; и по шкале “Са”: “самочувствие физическое: комфортное—дискомфортное” — говорит о наличии неудовлетворительного физического самочувствия, ощущении телесного дискомфорта. Также по данным опросника УПМС можно говорить о наличии выраженной степени утомления, выражающейся в ухудшении показателей деятельности, психического пресыщения, потере интереса к выполняемой работе и неосознанному стремлению к варьированию способов исполнения, и собственно, монотонии, выражающейся снижением тонуса и восприимчивости, ослаблением сознательного контроля, ухудшением внимания и памяти, стереотипизацией действий, появлением ощущения скуки и потерей интереса к работе.

Таким образом, по данным психологического тестирования, после проведения нейрофизиологического исследования у группы испытуемых в целом ухудшается ряд вышеописанных показателей, что свидетельствует в пользу наличия сформированного состояния монотонии и утомления.

Поведенческие показатели

В результате проведенного исследования было выявлено увеличение стандартной ошибки времени реакции при нажатии на пару изображений “животное—животное” в последнем тесте по сравнению с первым ($p < 0.05$). Вариабельность времени реакции по литературным данным является показателем способности к поддержанию внимания в процессе выполнения задачи [29], и его увеличение в Тесте 6 по сравнению с Тестом 1 согласуется с определением монотонии как функционального состояния человека, характеризующегося ослаблением сознательного контроля, ухудшением внимания и памяти, стереотипизацией действий и потерей интереса к работе.

Волны ПСС

Сравнительный анализ выявил статистически значимое снижение в Тесте 6 по сравнению с Тестом 1 амплитуды волн ПСС, регистрируемых после предъявления предупреждающего и NoGo стимулов. После предъявления предупреждающего стимула в Тесте 6 наблюдалось повышение волны P2 (рис. 2, верхний ряд), а также снижение волны P3 Cue (рис. 2, нижний ряд) и волны УНО (рис. 2, средний ряд). После предъявления императивного стимула различия наблюдались только по амплитуде волны P3 NoGo, которая также снижалась от первого теста к последнему (рис. 3).

Волна P3 Cue представляет собой положительное отклонение потенциала, начинающееся примерно через 300 мс после предъявления предупреждающего стимула и имеющую максимум на центрально-теменных электродах. Эта волна считается коррелятом процесса извлечения значимой информации из предупреждающего стимула [14, 18], направления внимания на императивный стимул [30] и активации программы соответствующего моторного ответа [31, 32]. По литературным данным источники волны P3 Cue локализируются в верхне-теменной коре, области, которую связывают с теменно-затылочной системой внимания [30]. Амплитуда волны P3 Cue в тестах на внимание отрицательно коррелирует со временем реакции и увеличивается после сеансов нейробиоуправления и транскраниальной стимуляции постоянным током вместе с улучшением внимания здоровых испытуемых [33]. Более того, у детей с синдромом нарушения внимания наблюдается снижение амплитуды этой волны по сравнению со здоровыми [30, 31]. Можно предположить, что снижение амплитуды волны P3 Cue в процессе развития монотонии может являться следствием ослабления внимания к последующему действию.

За волной P3 Cue следует негативное отклонение потенциала, которое продолжается до предъявления императивного стимула и называется условным негативным отклонением [17]. Эта волна состоит из двух компонентов: более ранняя лобно-центральная волна (О-волна) связана с ориентацией внимания и ожиданием императивного стимула, тогда как более поздняя волна (Е-волна) имеет более центральное распределение [34], как в нашем случае, и связана с подготовкой моторного ответа [35], в том числе, с поддержанием связи стимул–реакция и активацией моторного представительства кисти руки [36]. Источники генерации О-волны были обнаружены в таламусе, передней поясной и островковой коре, тогда как Е-волна генерируется в поясной и дополнительной моторной областях коры [35].

В данной работе мы обнаружили снижение амплитуды поздней составляющей волны ожидания, которую связывают с процессами подготовки моторного ответа. Подобные различия при развитии монотонии были выявлены также в предыдущих исследованиях [22, 23]. Снижение амплитуды УНО связывают с ослаблением ожидания стимула, которое, в свою очередь, является следствием снижения мотивации к выполнению задачи с развитием монотонии или утомления [22]. Подобные особенности были описаны как у здоровых испытуемых с низкой тревожностью по сравнению с испытуемыми с высокой тревожностью [37], так и у пациентов с психическими расстройствами, сопровождающимися нарушениями внимания, по сравнению со здоровыми, например, у пациентов с шизофренией [38, 39]. Связь УНО с успешной подготовкой к выполнению задания и параметрами производительности подчеркивается данными, показывающими повышенную амплитуду УНО в группе испытуемых, у которых снижено количество ошибок в тесте на внимание, по сравнению с группой испытуемых, которые делали больше ошибок и у которых амплитуда УНО была снижена [40]. В ряде работ было показано, что амплитуда волны ожидания негативно коррелирует с временем реакции при выполнении задачи [22, 41]. В нашем случае уменьшение амплитуды УНО не сопровождалось ни увеличением количества ошибок, ни увеличением среднего времени ре-

акции. Возможно, что уменьшение амплитуды волны ожидания является более чувствительным показателем развития монотонии, чем поведенческие показатели выполнения теста.

Несмотря на изменения волн ПСС, которые указывают на ослабление проактивного когнитивного контроля, качество выполнения Теста 6 практически не отличалось от Теста 1. Возможно, поддержание эффективности работы осуществлялось за счет изменения стратегии выполнения Go/NoGo теста, например, за счет компенсаторного усиления внимания на относительно ранних этапах обработки зрительных стимулов, которое отражалось в увеличении амплитуды волны P2.

Зрительная волна P2 имеет максимум в затылочных отведениях на временном интервале от 150 до 250 мс после предъявления зрительного стимула. Ее функциональный смысл связывают с кодированием зрительной информации в рабочей памяти [42], а также нисходящими влияниями от более высоких структур, включающих задние лобно-теменные области, которые обеспечивают фильтрацию сенсорной информации для более быстрой и эффективной обработки входящих стимулов за счет усиления внимания к релевантным стимулам [43–45].

Аналогично данным [46] в нашем исследовании в состоянии монотонии амплитуда P2 не менялась в затылочных отведениях, но увеличивалась в центрально-теменных и лобных областях. Можно предположить, что увеличение амплитуды P2 отражает большую мобилизацию ресурсов мозга для поддержания внимания к предупреждающему стимулу и эффективного выполнения задачи в ситуации, когда из-за развития монотонии исходной стратегии оказывается недостаточно [46].

Единственным показателем реактивного когнитивного контроля, который значимо менялся в процессе развития монотонии, была волна P3 NoGo, ее амплитуда снижалась в Тесте 6 по сравнению с Тестом 1. Эта волна имеет центральное распределение и регистрируется через 300–400 мс после предъявления стимула NoGo. Результаты предыдущих исследований показывают, что волна P3 NoGo отражает процесс подавления подготовленного действия [47, 48], и/или оценку результата подавления действия, либо оценку самого процесса подавления действия [41, 49]. Можно предполагать, что снижение этой волны в состоянии монотонии, так же как снижение волн P3 Cue и УНО, является следствием ослабления внимания к подготовке планируемого действия.

Подобные результаты по влиянию утомления на амплитуду волн P300 получали при анализе данных, зарегистрированных при выполнении других когнитивных тестов [24, 25]. Однако в ряде других работ изменений амплитуды P300 после выполнения утомляющих заданий обнаружено не было, возможно, потому что испытуемые выполняли задания недостаточно долго [22] или потому что для выявления различий сравнивались две разных группы испытуемых, которые выполняли одинаковые по длительности тесты, различающиеся по когнитивной нагрузке [27].

Результаты, полученные в данной работе, позволяют рассматривать волны P2, P3 Cue, P3 NoGo и УНО как возможные кандидаты на роль нейромаркеров монотонии, что делает перспективным использование этих показателей в системах мониторинга состояния человека во время выполнения операторской работы.

Известные ограничения данного исследования — то, что не исследована экологическая валидность полученных результатов, т.е. их переносимость на другие группы (например, отличные по возрасту или с другим уровнем образования). Для определения диагностически значимых порогов изменений требуется расширение нормативной базы данных — в первую очередь — исследования других возрастных групп.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Перед исследованием испытуемые подписывали информированное согласие на участие в исследовании, а также заполняли краткую анкету с данными о состоянии здоровья.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2021-291 от 15.04.2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня ““Павловский центр “Интегративная физиология — медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости””.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы, планирование эксперимента, разработка тестового задания (авторы М.В.П., С.М.Г., Б.Ю.А., Ш.Ю.А., Б.А.А., К.Г.В. и Ю.Д.К.), сбор данных (М.В.П., С.М.Г., Б.Ю.А.), обработка данных (М.В.П., С.М.Г., Х.Ю.Г.), написание и редактирование манускрипта (М.В.П., С.М.Г., Б.Ю.А., Х.Ю.Г., Ш.Ю.А., Б.А.А., К.Г.В. и Ю.Д.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Леонова АБ* (1984) Психодиагностика функциональных состояний человека. М. Изд-во Моск ун-та. [*Leonova AB* (1984) Psychodiagnostics of human functional states] М. Moscow Univer Press. (In Russ)].
2. *Hu X, Lodewijks G* (2020) Detecting fatigue in car drivers and aircraft pilots by using non-invasive measures: The value of differentiation of sleepiness and mental fatigue. *J Safety Res* 72: 173–187.
<https://doi.org/10.1016/j.jsr.2019.12.015>
3. *May JF, Baldwin CL* (2009) Driver fatigue: The importance of identifying causal factors of fatigue when considering detection and countermeasure technologies. *Transport Res Part F: Traffic Psychol Behav* 12(3): 218–224.
<https://doi.org/10.1016/j.trf.2008.11.005>
4. *Williamson A, Lombardi DA, Folkard S, Stutts J, Courtney TK, Connor JL* (2011) The link between fatigue and safety. *Accid Anal Prevent* 43: 498–515.
<https://doi.org/10.1016/j.aap.2009.11.011>
5. *Zhang Y, Ma J, Zhang C, Chang R* (2021) Electrophysiological frequency domain analysis of driver passive fatigue under automated driving conditions. *Scient Rep* 11: 20348.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-99680-4>
6. *Wascher E, Heppner H, Kobald SO, Arnau S, Getzmann S, Möckel T* (2016a) Age-Sensitive Effects of Enduring Work with Alternating Cognitive and Physical Load. A Study Applying Mobile EEG in a Real Life Working Scenario. *Front Hum Neurosci* 9: 711.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2015.00711>
7. *Wascher E, Getzmann S, Karthaus M* (2016b) Driver state examination—Treading new paths. *Accid Anal Prev* 91: 157–165.
<https://doi.org/10.1016/j.aap.2016.02.029>
8. *Tanaka M, Shigihara Y, Ishii A, Funakura M, Kanai E, Watanabe Y* (2012) Effect of mental fatigue on the central nervous system: An electroencephalography study. *Behav Brain Funct* 8(1): 48.
<https://doi.org/10.1186/1744-9081-8-48>
9. *Ahn S, Nguyen T, Jang H, Kim JG, Jun SC* (2016). Exploring neurophysiological correlates of drivers' mental fatigue caused by sleep deprivation using simultaneous EEG, ECG, and fNIRS data. *Front Human Neurosci* 10: 219.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00219>

10. Кирой ВН, Асланян ЕВ (2005) Общие закономерности формирования состояния монотонии. Журн высш нерв деят 55 (6): 768–776. [Kirov VN, Aslanyan EV (2005) General patterns of formation of the state of monotony. J Higher Nerv Activ 55 (6): 768–776. (In Russ)].
11. Лебедева НН, Каримова ЕД (2014) Нейрофизиологические проявления состояния монотонии у операторов с различной межполушарной асимметрией альфа-активности. Журн высш нерв деят 64(4): 428. [Lebedeva NN, Karimova ED (2014) Neurophysiological manifestations of the state of monotony in operators with different interhemispheric asymmetry of alpha activity. J Higher Nerv Activ 64 (4): 428. (In Russ)].
12. Wang C, Li B, Yao Y (2021) Proactive Control Mediates the Relationship Between Working Memory and Math Ability in Early Childhood. Front Psychol 12: 611429. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.611429>
13. Kropotov JD, Pronina MV, Ponomarev VA, Poliakov YI, Plotnikova IV, Mueller A (2019) Latent ERP components of cognitive dysfunctions in ADHD and schizophrenia. Clin Neurophysiol 130(4): 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2019.01.015>
14. Kropotov J, Ponomarev V, Tereshchenko EP, Müller A, Jäncke L (2016) Effect of Aging on ERP Components of Cognitive Control. Front Aging Neurosci 8: 69. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00069>
15. Braver TS (2012) The variable nature of cognitive control: a dual mechanisms framework. Trends Cogn Sci 16(2): 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.12.010>
16. Näätänen R, Picton TW (1986) N2 and automatic versus controlled processes. Electroencephal Clin Neurophysiol Suppl 38: 169–186.
17. Walter WG, Cooper R, Aldridge VJ, McCallum WC, Winter AL (1964) Contingent Negative Variation: an electric sign of sensori-motor association and expectancy in the human brain. Nature (Lond) 203: 380.
18. Bekker EM, Kenemans JL, Verbaten MN (2004) Electrophysiological correlates of attention, inhibition, sensitivity and bias in a continuous performance task. Clin Neurophysiol 115: 2001–2013.
19. Verleger R (2020) Effects of relevance and response frequency on P3b amplitudes: Review of findings and comparison of hypotheses about the process reflected by P3b. Psychophysiology 57(7): e13542. <https://doi.org/10.1111/psyp.13542>
20. Barkley RA (1997) Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. Psychol Bull 121(1): 65–94. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.121.1.65>
21. van Veen V, Carter CS (2002) The anterior cingulate as a conflict monitor: fMRI and ERP studies. Physiol Behav 77(4–5): 477–482. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00930-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00930-7)
22. Boksem MA, Meijman TF, Lorist MM (2006) Mental fatigue, motivation and action monitoring. Biol Psychol 72(2): 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2005.08.007>
23. Lorist MM (2008) Impact of top-down control during mental fatigue. Brain Res 1232: 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.053>
24. Käthner I, Wriessneger SC, Müller-Putz GR, Kübler A, Halder S (2014) Effects of mental workload and fatigue on the P300, alpha and theta band power during operation of an ERP (P300) brain-computer interface. Biol Psychol 102: 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2014.07.014>
25. Jia H, Lin CJ, Wang EM (2022) Effects of mental fatigue on risk preference and feedback processing in risk decision-making. Sci Rep 12: 10695. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14682-0>
26. Сериков ВВ, Обознов АА, Колягин ВЯ, Закревская АА (2018) Применение когнитивного вызванного потенциала Р-300 для оценки работы мозга машинистов. Организ психол и психол труда 3(2): 166–182. [Serikov ВВ, Oboznov АА, Kolyagin VYA, Zakrevskaya АА (2018) The use of cognitive evoked potential P-300 to assess the work of the brain of machinists. Organizat Psychol and Psychol Work 3(2): 166–182. (In Russ)].
27. Takács E, Barkaszi I, Altbäcker A, Czigler I, Balázs L (2019) Cognitive resilience after prolonged task performance: an ERP investigation. Exp Brain Res 237(2): 377–388. <https://doi.org/10.1007/s00221-018-5427-8>
28. Maris E, Oostenveld R (2007) Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. J Neurosci Methods 164(1): 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.03.024>

29. Reteig LC, van den Brink RL, Prinssen S, Cohen MX, Slagter HA (2019) Sustaining attention for a prolonged period of time increases temporal variability in cortical responses. *Cortex* 117: 16–32. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2019.02.016>
30. Albrecht B, Brandeis D, Uebel-von Sandersleben H, Valko L, Heinrich H, Xu X, Drechsler R, Heise A, Kuntsi J, Müller UC, Asherson P, Steinhausen HC, Rothenberger A, Banaschewski T (2014) Genetics of preparation and response control in ADHD: the role of DRD4 and DAT1. *J Child Psychol Psychiatry* 55(8): 914–923. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12212>
31. Grane VA, Brunner JF, Endestad T, Aasen IES, Kropotov J, Knight RT, Solbakk AK (2016) ERP Correlates of Proactive and Reactive Cognitive Control in Treatment-Naïve Adult ADHD. *PLoS One* 11(7): e0159833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159833>
32. Elke S, Wiebe SA (2017) Proactive control in early and middle childhood: An ERP study. *Dev Cogn Neurosci* 26: 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2017.04.005>
33. Rêgo GG, Gonçalves ÓF, Boggio PS (2022) Attention neuroenhancement through tDCS or neurofeedback: a randomized, single-blind, controlled trial. *Sci Rep* 12(1): 17613. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22245-6>
34. Rohrbaugh JW, McCallum WC, Gaillard AW, Simons RF, Birbaumer N, Papakostopoulos D (1986) ERPs associated with preparatory and movement-related processes. A review. *Electroencephal Clin Neurophysiol Suppl* 38: 189–229.
35. Aydin M, Carpenelli AL, Lucia S, Di Russo F (2022) The Dominance of Anticipatory Prefrontal Activity in Uncued Sensory-Motor Tasks. *Sensors (Basel)* 22(17): 6559. <https://doi.org/10.3390/s22176559>
36. Kóbor A, Kardos Z, Horváth K, Janacsek K, Takács Á, Csépe V, Nemeth D (2021) Implicit anticipation of probabilistic regularities: Larger CNV emerges for unpredictable events. *Neuropsychologia* 156: 107826. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2021.107826>
37. Wu Y, Ma S, He X, Xiang S, Qi S (2021) Trait anxiety modulates the temporal dynamics of Stroop task switching: An ERP study. *Biol Psychol* 163: 108144. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2021.108144>
38. Osborne KJ, Kraus B, Lam PH, Vargas T, Mittal VA (2020) Contingent Negative Variation Blunting and Psychomotor Dysfunction in Schizophrenia: A Systematic Review. *Schizophr Bull* 46(5): 1144–1154. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa043>
39. Catalano LT, Wynn JK, Green MF, Gold JM (2022) Reduced neural activity when anticipating social versus nonsocial rewards in schizophrenia: Preliminary evidence from an ERP study. *Schizophr Res* 246: 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2022.05.028>
40. Hohnsbein J, Falkenstein M, Hoormann J (1998) Performance differences in reaction tasks are reflected in event-related brain potentials (ERPs). *Ergonomics* 41(5): 622–633. <https://doi.org/10.1080/001401398186793>
41. Aasen IE, Brunner JF (2016) Modulation of ERP components by task instructions in a cued go/no-go task. *Psychophysiology* 53(2): 171–185. <https://doi.org/10.1111/psyp.12563>
42. Finnigan S, O'Connell RG, Cummins TDR, Broughton M, Robertson IH (2011) ERP measures indicate both attention and working memory encoding decrements in aging. *Psychophysiology* 48: 601–611. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2010.01128.x>
43. Freunberger R, Klimesch W, Doppelmayr M, Höller Y (2007) Visual P2 component is related to theta phase-locking. *Neurosci Lett* 426: 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.08.062>
44. Cepeda-Freyre HA, Garcia-Aguilar G, Eguibar JR, Cortes C (2020) Brain Processing of Complex Geometric Forms in a Visual Memory Task Increases P2 Amplitude. *Brain Sci* 10(2): 114. <https://doi.org/10.3390/brainsci10020114>
45. Male AG, O'Shea RP (2023) Attention is required for canonical brain signature of prediction error despite early encoding of the stimuli. *PLoS Biol* 21(6): e3001866. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001866>
46. Sun L, Guo Z, Yuan X, Wang X, Su C, Jiang J, Li X (2022) An Investigation of the Effects of Brain Fatigue on the Sustained Attention of Intelligent Coal Mine VDT Operators. *Int J Environ Res Public Health* 19(17): 11034. <https://doi.org/10.3390/ijerph191711034>

47. Bokura H, Yamaguchi S, Kobayashi S (2001) Electrophysiological correlates for response inhibition in a Go/NoGo task. *Clin Neurophysiol* 112(12): 2224–2232.
[https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(01\)00691-5](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(01)00691-5)
48. Wessel JR, Aron AR (2014) It's not too late: The onset of the frontocentral P3 indexes successful response inhibition in the stop-signal paradigm. *Psychophysiology* 52: 472–480.
<https://doi.org/10.1111/psyp.12374>
49. Huster RJ, Enriquez-Geppert S, Lavalée CF, Falkenstein M, Herrmann CS (2013) Electroencephalography of response inhibition tasks: Functional networks and cognitive contributions. *Int J Psychophysiol* 87: 217–233.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2012.08.001>

Event-Related Potentials in Cued Go/NoGo Task are Possible Neuromarkers of Monotony

M. V. Pronina^{a, *}, M. G. Starchenko^a, Yu. A. Boytsova^a, A. A. Bogdan^a,
Yu. G. Khomenko^a, G. V. Kataeva^a, Yu. A. Shichkina^a, and Yu. D. Kropotov^a

^a*Saint-Petersburg Electrotechnical University “LETI”, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: marina.v.pronina@gmail.com*

Monotony or mental fatigue occurs during performing low-content and monotonous work, including the work of the operator. It is accompanied by a decrease in the concentration of attention and the speed of its switching, as well as slowing in the processes of perception and motor reactions, which can lead to a loss of vigilance, self-control and the occurrence of drowsiness and, consequently, an increase in the risk of industrial injuries and accidents. In this regard, an urgent task is to develop methods for monitoring the human condition in the process of performing monotonous activities. We investigated the effect of monotony on event-related potentials (ERPs) in the visual cued Go/NoGo test. We analyzed 31-channel EEG data of 25 healthy subjects recorded before and after performing four tests with a total duration of around 1.5 hours, representing the same type of tasks with different instructions and simulating the conditions of monotonous work. After performing four tests, we observe an increase of P2 wave, decrease of the P3 Cue wave and the contingent negative variation (CNV) wave in the Cue condition, as well as the decrease of P300 wave in the NoGo condition. The results obtained in this work are assumed to reflect attenuation in proactive and reactive cognitive control during monotony and allow us to consider the P2, P3 Cue, CNV and P3 NoGo waves as possible candidates for the role of neuromarkers of monotony, which makes it promising to use these indicators in systems for monitoring the human condition during operating work.

Keywords: event-related potentials, Go/NoGo task, monotony, cognitive control, P2, P300, contingent negative variation (CNV)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РАСПАД ДЕСМИНА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ У ПАЦИЕНТОВ
В ХРОНИЧЕСКОМ КРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

© 2023 г. С. А. Тыганов^{1, *}, К. А. Зарипова¹, О. В. Туртикова¹, Е. Н. Скитева^{1, 2},
С. П. Белова¹, Ю. М. Забродская², С. А. Кондратьев³, Е. А. Кондратьева^{2, 4},
А. Н. Кондратьев², Б. С. Шенкман¹

¹Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

²Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт
им. профессора А.Л. Поленова, Санкт-Петербург, Россия

³AIMIS Healthcare Group, Clinic Athonitissa, Limassol, Cyprus

⁴Военно-медицинская академии им. С.М. Кирова Министерства обороны РФ,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: s.a.tyganov@gmail.com

Поступила в редакцию 27.09.2023 г.

После доработки 12.10.2023 г.

Принята к публикации 22.10.2023 г.

Пациенты в хроническом критическом состоянии теряют значительную часть мышечной массы за время пребывания в отделении интенсивной терапии, что может иметь долгосрочные пагубные последствия. В том числе, это приводит к разрушению целостности цитоскелета мышц, и в настоящее время нет полноценных исследований, описывающих механизмы развития этого процесса. Целью данной работы было исследование сигнальных процессов, приводящих к распаду десмина у пациентов при миопатии критических состояний (critical illness myopathy, CIM). Инцизионные мышечные биопсии из камбаловидной мышцы были взяты у 6 пациентов, проходящих лечение в РНХИ им. проф. А.Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова, с хроническим нарушением сознания (не менее 2 мес.). В качестве контроля использовали мышечные биоптаты, взятые у здоровых мужчин с помощью игольчатой биопсии. Биопсии замораживались в жидком азоте для дальнейшего проведения вестерн-блот и ПЦР-анализа, а также иммуногистохимического исследования. Проведенный анализ показал, что у 4 из 6 исследованных пациентов визуально были выявлены волокна с измененной гистологической картиной десмина. Мы также наблюдали достоверное снижение содержания десмина на 69% и снижение содержания его мРНК на 24% у пациентов с CIM. Распад десмина может быть связан с повышенной активностью кальпаина и с активацией убиквитин-протеасомной системы. В данной работе содержание кальпаина-1 повышалось в условиях CIM на уровне белка и не изменялось на уровне мРНК. Мы наблюдали изменения в фосфорилировании GSK3- β (Ser9), что является ключевым этапом деполимеризации десминовых филаментов кальпаином-1. Исследование убиквитинлигаз, в свою очередь, показало достоверное увеличение экспрессии Trim32 на 155%, при снижении экспрессии Atrogin1 и MuRF1. Таким образом, в данной работе наблюдалось снижение содержания десмина в условиях CIM. Распад десмина может быть связан с увеличением его фосфорилирования с помощью GSK3 β и дальнейшим расщеплением кальпаином-1. Кроме того, мы зафиксировали повышенную экспрессию E3-убиквитинлигазы Trim32, активность которой, судя по литературным данным, также повышается после фосфорилирования десмина.

Ключевые слова: хроническое нарушение сознания, хроническое критическое состояние, скелетная мышца, десмин, миопатия критических состояний, убиквитинлигазы, протеолиз

DOI: 10.31857/S0869813923120129, **EDN:** CHNTIY

ВВЕДЕНИЕ

Достижения в области интенсивной терапии позволили большему количеству пациентов пережить острое критическое состояние, но они также способствовали появлению большого количества пациентов, которые переходят из комы в состояния хронического нарушения сознания (вегетативное состояние и состояние минимального сознания) [1, 2]. Пациенты в хроническом критическом состоянии [3] теряют значительную часть мышечной массы за время пребывания в отделении интенсивной терапии, что может иметь долгосрочные пагубные последствия. Миопатия критических состояний (critical illness myopathy, CIM) представляет собой нервно-мышечное расстройство, часто наблюдаемое в отделении интенсивной терапии [4]. Основным признаком CIM является мышечная слабость, которая носит диффузный характер с вовлечением всех мышц конечностей и сгибателей шеи, а часто лицевых мышц и диафрагмы [5]. CIM также характеризуется мышечной атрофией и потерей миозина и связанных с миозином белков [4, 6–8]. Острые и продолжительные функциональные последствия CIM значительно зависят от возраста, сопутствующих заболеваний и продолжительности пребывания в отделении интенсивной терапии [9]. Поражение мышц у пациентов в хроническом критическом состоянии по своей природе неспецифично и является следствием нескольких процессов: адаптивной реакции на тяжелое повреждение как центральной, так и периферической нервной системы, неспецифического воздействия лекарственных препаратов. Развитие знаний о патофизиологии критических состояний и совершенствование оказания помощи на современном этапе привели к улучшению выживаемости пациентов в критическом состоянии [10]. Мышечная атрофия при критических состояниях является одной из основных причин смертности в палате интенсивной терапии, но молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, в значительной степени неизвестны [11].

В каждой мышечной клетке присутствуют многочисленные белки цитоскелета. Различные миопатии, в том числе и CIM, напрямую связаны с изменением в содержании и взаимодействии этих белков. В скелетных мышцах основной единицей сокращения является саркомер, состоящий из множества структурных и регуляторных белков. Белки промежуточных филаментов (в том числе, десмин) служат каркасом, который соединяет миофибриллы между собой и с другими органеллами (такими, как митохондрии или ядро), чтобы поддерживать клеточную целостность и способствовать механотрансдукции [12]. В работах, где исследовались мутации и посттрансляционные модификации десмина человека, были нарушения цитоскелетной сети, что приводило к потере функции как десмина, так и его партнеров по связыванию, а также к потенциальным токсическим эффектам образовавшихся агрегатов [13]. Следовательно, координированное действие всех узлов цитоскелета имеет решающее значение для обеспечения правильной сократительной функции мышц, а нарушение целостности любого компонента часто приводит к сердечной или скелетной миопатии [12]. Недавно был выявлен механизм, способствующий разборке десминовых филаментов, которая приводит к разрушению миофибрилл во время мышечной атрофии, вызванной денервацией или голоданием [14]. Индукция этого механизма связана с активностью GSK-3 β , кальпаина и убиквитинлигазы Trim32 [14, 15]. Авторы предположили, что фосфорилирование десмина с помощью GSK-3 β способствует его убиквитинированию с помощью Trim32 и по-

следующей его деполимеризации кальпаином-1, что ведет к разборке миофибрилл и атрофии мышечных волокон [14, 16]. Целью данной работы явилась проверка гипотезы о возможном влиянии этого пути на распад десмина в камбаловидной мышце человека в условиях длительной миопатии критических состояний.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Взятие мышечных биопсий у пациентов

Инцизионные мышечные биопсии из камбаловидной мышцы были взяты у 6 пациентов в хроническом критическом состоянии (на рисунках и в результатах обозначены С1), проходивших лечение в отделении анестезиологии и реанимации РНХИ им. проф. А.Л. Поленова — филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова. В исследование включались пациенты с хроническим нарушением сознания не менее 2 месяцев. Критерии исключения: инфекция в области забора биопсийного материала, непереносимость местных анестетиков, индекс массы тела (ИМТ) не ниже 15, наличие выраженного системного воспалительного ответа и сепсиса, а также нестабильности витальных функций. В условиях “малой хирургической операции”, осуществлялся забор исследуемой ткани под местной анестезией 1%-ным раствором ропивакаина.

В качестве контроля (на рисунках и в результатах обозначены Соп) использовали мышечные биоптаты, взятые у здоровых мужчин с помощью игольчатой биопсии под местной анестезией. В горизонтальном положении в помещении, предназначенном для хирургических манипуляций, проводили местную анестезию путем внутривенной инъекции 2%-ного раствора лидокаина над поверхностью задней группы мышц голени. Затем выполняли кожный разрез с помощью однократного хирургического лезвия и производили стерильный забор ткани с помощью биопсийной аспирационной иглы Бергстрема. После извлечения иглы рану обрабатывали гемостатической губкой и закрывали бактерицидным лейкопластырем. После взятия биопсии у пациентов с хроническим критическим состоянием и у здоровых добровольцев мышечная ткань в течение одной минуты замораживалась в жидком азоте для последующих анализов.

Анализ экспрессии генов

Для анализа экспрессии мРНК генов из мышечной ткани с помощью набора RNeasy micro kit (Qiagen, США) была выделена тотальная фракция РНК и использована в качестве матрицы для проведения обратной транскрипции с последующей ПЦР-реакцией. Для проведения обратной транскрипции были использованы компоненты фирмы “Синтол” (Россия): 30 мкМ случайных гексануклеотидов, 17,4 мкМ олиго-d(T)15, 1,3 мМ дНТФ, 0,02 ед./мкл ингибитора РНКазы, 6 ед./мкл М-MLV-ревертазы, 5х-буфер для М-MLV-ревертазы. Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, “Bio-Rad Laboratories”, США). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали полученную в результате обратной транскрипции кДНК, праймеры с концентрацией 10 мкМ мастер-микс (0,3 мМ дНТФ, 3 мМ MgCl₂, 2,5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б (рН 8,8), 0,06 ед./мкл Taq ДНК-полимеразы, “Синтол”). Нормирование данных ПЦР проводили на экспрессию housekeeping гена *GAPDH*. Все праймеры, использовавшиеся в эксперименте, представлены в табл. 1.

Анализ содержания белков в тотальной фракции камбаловидной мышцы

Для выделения тотальной белковой фракции был использован набор реагентов RIPA Lysis Buffer System (“Santa Cruz”, США). При этом дополнительно использо-

Таблица 1. Список использованных в работе праймеров

Ген	Последовательность праймеров
<i>MuRF-1</i>	GCCAATTTGGTGCTTTTGT AAATTCAGTCCTCTCCCCGT
<i>MAFbx</i>	CTACGATGTTGCAGCCAAGA GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC
<i>Trim32</i>	CTCGGAAGTTCTTCACAGGCTC CTCCAGTAGTGCTACATCTGCC
<i>Desmin</i>	CTGAGCAAAGGGGTTCTGAG CTTCAGGGAGCAGTGAGGAC
<i>Calpain</i>	TGTCGGAGGAGATCATCACG TCTTGAGGAATTGGGACCC
<i>GAPDH</i>	ACCCAGAAGACTGTGGATG TTCAGCTCAGGGATGACCTT

вались ингибиторы протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail (“Santa Cruz”, США), 10 мкг/мл апротинина (“SIGMA”, США), 10 мкг/мл лейпептина (“SIGMA”, США), 10 мкг/мл пепстатина (“SIGMA”, США), 20 мкл “complete Mini Protease Inhibitor Cocktail” (Roche, Швейцария), 40 мкл фосфоингибиторного коктейля (Santa Cruz, США).

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) образцы разводились в двукратном буфере для образцов (5.4 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4%-ный Ds-Na, 20%-ный глицерин, 10%-ный β -меркаптоэтанол, 0.02%-ный бромфеноловый синий). Электрофорез был проведен в 10%-ном разделяющем ПААГ. Образцы группы С1 загружались на один гель с контрольными образцами. Электрофорез проводили при силе тока 17 мА на гель в мини-системе (“Bio-Rad Laboratories”) при комнатной температуре. Электроперенос белков проводили на нитроцеллюлозную мембрану при 100 В при температуре 4°C в течение 120 мин в системе mini Trans-Blot (“Bio-Rad Laboratories”). После электропереноса НЦ-мембраны инкубировали в растворе 5%-ного сухого молока (“Bio-Rad Laboratories”) в PBST (PBS + 0.1% Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления белковых полос использовали первичные поликлональные антитела: фосфорилированной (Ser9) GSK3 β (“cell signalling”, #9323, 1 : 1000, США), тотальной GSK3 β (“cell signalling”, #9315, 1 : 1000, США), фосфорилированной (Ser473) АКТ (“cell signalling”, #9271, 1 : 1000, США), тотальной АКТ (“cell signalling”, #9272, 1 : 1000, США), десмина (“cell signalling”, #4024, 1 : 2000, США), кальпаина (“santa cruz”, #sc-58323, 1 : 1000, США). В качестве вторичных антител использовали антитела goat anti-rabbit, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz, США) в разведении 1 : 50000. Инкубация блотов с первичными антителами проводилась в течение ночи при 4°C, со вторичными антителами 1 ч при комнатной температуре. Анализ белковых полос проводили с использованием C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biotechnology, США). Все измерения плотности изображений проводились в линейном диапазоне проявляющего реагента и сканера. Медиану оптического поглощения (ОП) полос вывешенной группы делили на медиану ОП полос соответствующей контрольной группы, отличия выражали в процентах. Медиану ОП полос контрольной группы принимали за 100%. Статистическая обработка данных вестерн-блота производилась с помощью программы Image Studio Digits Ver4.0.

Иммуногистохимический анализ десмина

С помощью микротомы Leica CM1900 изготавливали поперечные срезы замороженной мышцы толщиной 9 мкм. Срезы высушивали на воздухе и хранили при -20°C . Перед окрашиванием срезы оттаивали и регидратировали при комнатной температуре в фосфатно-буферном растворе (PBS) в течение 20 мин, а затем инкубировали с антителами против десмина ("cell signalling", #4024, 1 : 2000, США) 1 : 400 в PBS во влажной камере при 37°C в течение часа (или при 4°C в течение ночи). Затем антитела отмывали в PBS 3 раза по 5 мин. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor, 1 : 500 в PBS проводили в течение 40 мин при комнатной температуре. После отмывки вторичных антител срезы заключали в среду, стабилизирующую флуоресцентную метку. Срезы анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа LeicaQ500MC с встроенной цифровой фотокамерой (TCM 300F, Leica, Германия), с увеличением $\times 200$.

Статистическая обработка данных

Данные по содержанию белков представлены как средние $\pm SEM$, данные о содержании мРНК представлены в виде максимума, минимума и интерквартильной широты (0.25–0.75). Средние значения всех групп показаны в % от контроля. Чтобы проверить, были ли различия между группами статистически значимы, учитывая небольшой размер выборки и сравнения между двумя группами, был использован непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Значение p менее 0.05 расценивали как статистически значимое.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Атрофия волокон в условиях миопатии критических состояний происходит со средней скоростью 3–4% площади поперечного сечения волокна в день и связана с потерей филаментной структуры миозина [17]. Потеря этой структуры происходит до существенной деградации актина и белков цитоскелета и связана с повышенной экспрессией лизосомальных ферментов и убиквитина [17]. Изменения в иммуномаркировке десмина является надежным индикатором этих изменений, поскольку трехмерный нитевидный каркас, образуемый промежуточными филаментами, играет центральную роль в структурной и функциональной ориентировке и закреплении миофибрилл, расположении клеточных органелл и сигнальных событиях [18]. Проведенный нами иммуногистохимический анализ показал, что у 4 из 6 исследованных пациентов в хроническом критическом состоянии визуально были выявлены волокна с измененной гистологической картиной десмина. При этом аномальное окрашивание десмина не было зафиксировано у двух пациентов с наименьшей длительностью пребывания в хроническом критическом состоянии. Наблюдались следующие аномальные паттерны окрашивания на десмин: отсутствие иммунореактивности (рис. 1б, указано стрелками), снижение общей интенсивности сигнала десмина, наличие небольших субсарколеммальных и саркоплазматических агрегатов десмина (рис. 1б). Зафиксированные в данной работе аномалии соответствуют изменениям, которые часто наблюдаются при различных десминопатиях, где первичной клинической особенностью является прогрессирующая мышечная слабость [18–20]. Для миопатии критических состояний ранее была также показана повышенная иммунореактивность десмина в волокнах меньшего размера [17], которая наблюдалась и в данной работе (рис. 1).

Мы также наблюдали достоверное снижение содержания десмина на 69% (рис. 2а) и снижение содержания его мРНК (рис. 3а) на 24% в группе С1 относительно контроля. Распад десмина может быть связан с повышенной активностью кальпаина и

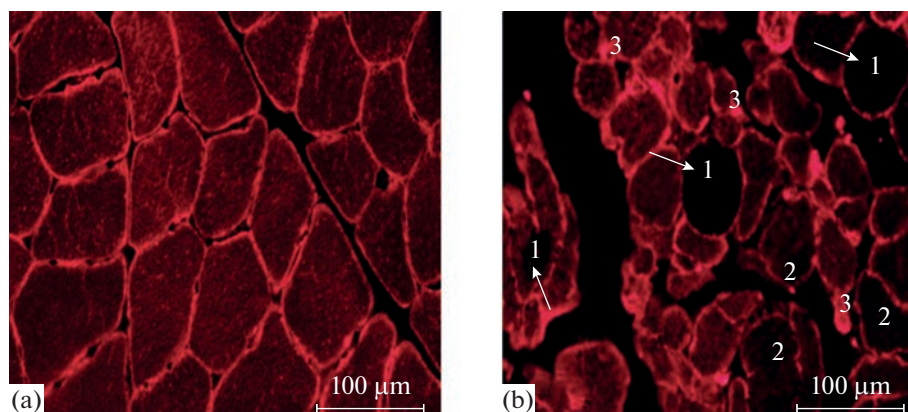


Рис. 1. Окрашивание волокон *m. soleus* на десмин у здоровых людей (a) и людей с СИМ (b). 1 — отсутствие иммуореактивности — десмин-негативные волокна, 2 — снижение общей интенсивности сигнала десмина, 3 — наличие небольших субсарколеммальных и саркоплазматических агрегатов десмина.

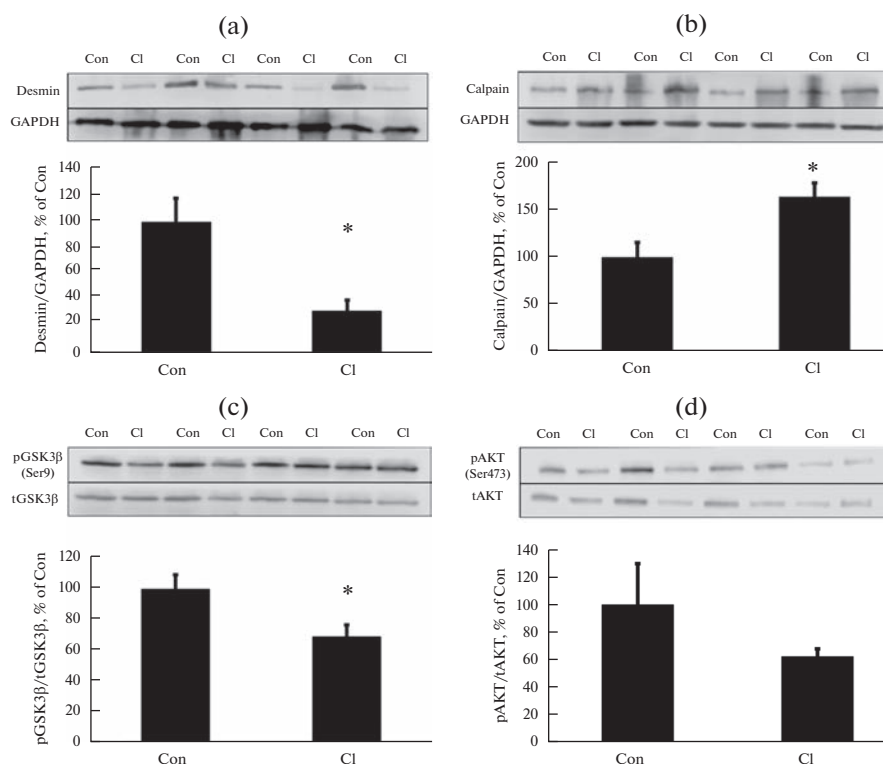


Рис. 2. Содержание десмина (a), кальпаина (b) и уровень фосфорилирования GSK3β (c) и АКТ (d). Con — здоровые люди, CI — критические состояния. Данные представлены в виде средних ± стандартная ошибка среднего. * — достоверное отличие от Con.

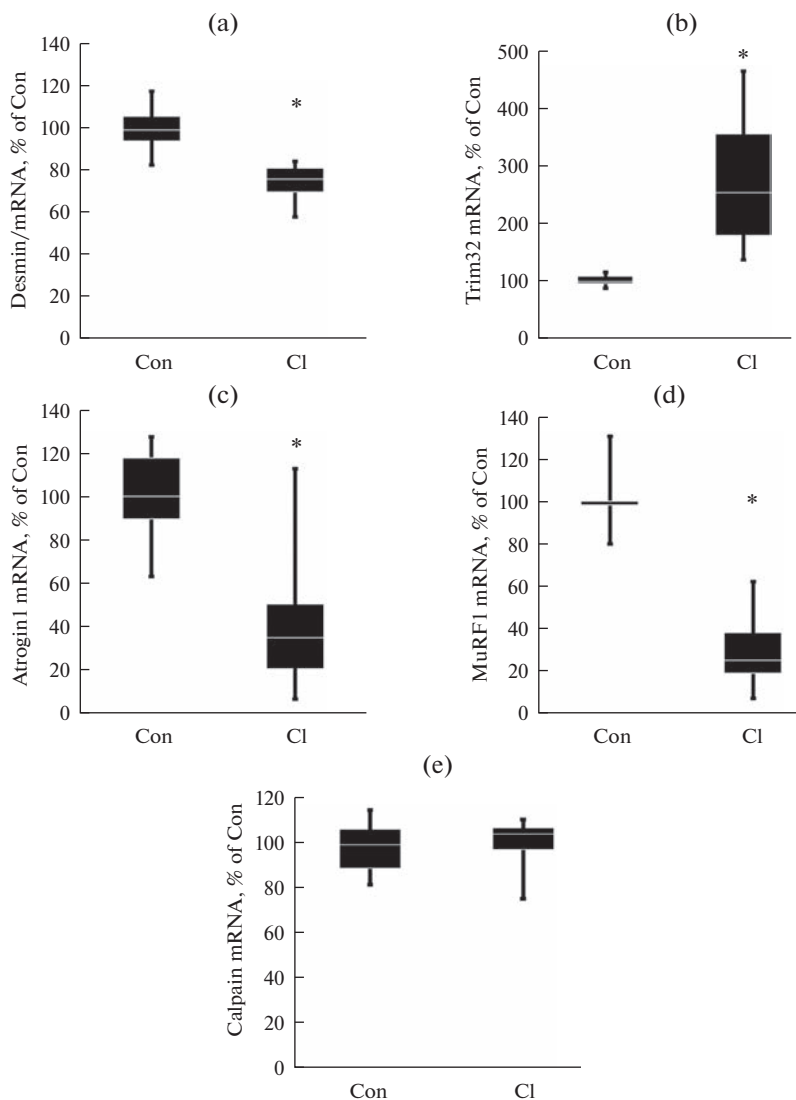


Рис. 3. Содержание мРНК десмина (а), Trim32 (b), Atrogin1 (с), MuRF1 (d), Calpain (е). Con – здоровые люди, CI – критические состояния. Данные представлены в виде максимума, минимума и интерквартильной широты (0.25–0.75). * – достоверное отличие от Con.

с активацией убиквитин-протеасомной системы. Содержание кальпаина-1 повышалось в условиях СИМ на уровне белка (рис. 2b), и не изменялось на уровне мРНК (рис. 3е). Фосфорилирование GSK3- β является начальным ключевым этапом селективной деполимеризации десминовых филаментов кальпаином-1 и, как следствие, потери миофибрилл [14]. В условиях СИМ наблюдалось достоверное снижение ингибирующего фосфорилирования GSK3- β (Ser9) (рис. 2с), которое осуществляется протеинкиназой В (АКТ). Активность АКТ, в свою очередь, определяется ее фосфорилированием по сайту Ser473, и в данной работе мы наблюдали тенденцию к его снижению (рис. 2d).

Потеря мышечной массы или мышечная атрофия происходит, когда деградация белка превышает синтез белка, и ключевым событием является влияние убиквитин-протеасомной системы. Две важнейших E3-убиквитинлигазы, которые были обнаружены при различных моделях разгрузки скелетных мышц, это специфичные для мышц Atrogin-1 и MuRF-1 [21–23]. Кроме того, в последнее время было показано участие в атрофических процессах скелетных мышц неспецифичной для мышц E3-убиквитинлигазы Trim32 [14]. В скелетной мышце на моделях механической разгрузки для этих трех убиквитинлигаз было зафиксировано убиквитинирование десмина [24–26]. Кроме того, рост Atrogin1 и MuRF1 был ранее показан на экспериментальной модели искусственной вентиляции легких грызунов в течение 4, 8 и 14 дней [27]. Изучение экспрессии Trim32 показало достоверное увеличение его мРНК на 155% (рис. 3b). При этом экспрессия Atrogin1 и MuRF1, наоборот, достоверно снизилась (рис. 3c, 3d). Ранее в работах с использованием модели гравитационной разгрузки мышц задних конечностей грызунов было показано, что рост экспрессии убиквитинлигаз MuRF1 и Atrogin1 постепенно снижается с увеличением длительности разгрузки. Так, после 3 сут вывешивания экспрессия этих убиквитинлигаз была выше контрольного уровня на 230 и 110% соответственно, к седьмым суткам уже на 27 и 52% [28], а с 14-х и по 28-е сут этот рост вообще отсутствовал. Также в экспериментах с иммобилизацией конечностей человека в течение двух недель был показан рост экспрессии MuRF1 и Atrogin1 [29], а на более поздних сроках эти убиквитинлигазы, наоборот, снижали свою экспрессию [30]. Исходя из этих фактов, мы считаем, что снижение экспрессии MuRF1 и Atrogin1 в проведенном эксперименте связан с высокой продолжительностью развития СИМ, и более важную роль начинает играть Trim32.

Таким образом, в данной работе мы наблюдали достоверное значительное снижение содержания десмина в условиях СИМ. Распад десмина может быть связан с увеличением его фосфорилирования с помощью GSK3 β и дальнейшим расщеплением кальпаином-1. Кроме того, мы зафиксировали повышенную экспрессию E3-убиквитинлигазы Trim32, активность которой, судя по литературным данным, также повышается после фосфорилирования десмина.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Забор биоптатов скелетных мышц проводили в диагностических целях с согласия законных представителей пациентов. Исследование одобрено локальным Этическим комитетом № 1411-20 (выписка из протокола заседания № 11-20 от 16 ноября 2020 г.) Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 22-25-00615).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента Б.С.Ш., А.Н.К., Ю.М.З., С.А.К. Сбор материала биопсии С.А.К., Е.Н.С. Сбор данных С.А.Т., Е.Н.С., С.П.Б., К.А.З., О.Н.Т. Обработка

данных С.А.Т., С.П.Б., К.А.З., О.Н.Т. Написание и редактирование манускрипта С.А.Т., Б.С.Ш., Е.А.К., С.А.К., Ю.М.З.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Е.М. Ледневу и Т.Ф. Вепхвадзе за проведение игольчатой биопсии, К.К. Куканову, Н.Е. Войнову за выполнение забора биопсионного материала у исследуемой группы больных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nelson JE, Cox CE, Hope AA, Carson SS (2010) Chronic critical illness. *A J Respirat Crit Care Med* 182(4): 446–454.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0210CI>
2. van Erp WS, Lavrijsen JC, Vos PE, Bor H, Laureys S, Koopmans RT (2015) The vegetative state: prevalence, misdiagnosis, and treatment limitations. *J Am Med Dir Assoc* 16(1): e85–e89.
<https://doi.org/10.1016/j.jamda.2014.10.014>
3. Parfenov AL, Razzhivin VP, Petrova MV (2022) Chronic Critical Illness: Current Aspects of the Problem (Review). *Sovrem Tekhnol Med* 14(3): 70–81.
<https://doi.org/10.17691/stm2022.14.3.08>
4. Llano-Diez M, Cheng AJ, Jonsson W, Ivarsson N, Westerblad H, Sun V, Cacciani N, Larsson L, Bruton J (2016) Impaired Ca^{2+} release contributes to muscle weakness in a rat model of critical illness myopathy. *Critic Care Med* 20(1): 254.
<https://doi.org/10.1186/s13054-016-1417-z>
5. Bolton CF (2005) Neuromuscular manifestations of critical illness. *Muscle & Nerve* 32(2): 140–163.
<https://doi.org/10.1002/mus.20304>
6. Larsson L, Li X, Edstrom L, Eriksson LI, Zackrisson H, Argentini C, Schiaffino S (2000) Acute quadriplegia and loss of muscle myosin in patients treated with nondepolarizing neuromuscular blocking agents and corticosteroids: mechanisms at the cellular and molecular levels. *Critic Care Med* 28(1): 34–45.
<https://doi.org/10.1097/00003246-200001000-00006>
7. Latronico N, Tomelleri G, Filosto M (2012) Critical illness myopathy. *Curr Opin Rheumatol* 24(6): 616–622.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283588d2f>
8. Lacomis D, Zochodne DW, Bird SJ (2000) Critical illness myopathy. *Muscle & Nerve* 23(12): 1785–1788.
[https://doi.org/10.1002/1097-4598\(200012\)23:12<1785::aid-mus1>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/1097-4598(200012)23:12<1785::aid-mus1>3.0.co;2-j)
9. Meznaric M, Angelini C (2016) Intensive Care Unit-Acquired Weakness. In: *Angelini C* (ed) *Acquired Neuromuscular Disorders: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. Springer Int Publ. Cham. 163–175.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-29514-5_13
10. Addinsall AB, Cacciani N, Akkad H, Salah H, Tchkonja T, Kirkland JL, Larsson L (2021) JAK/STAT inhibition augments soleus muscle function in a rat model of critical illness myopathy via regulation of complement C3/3R. *J Physiol* 599(11): 2869–2886.
<https://doi.org/10.1113/JP281220>
11. Aare S, Radell P, Eriksson LI, Chen YW, Hoffman EP, Larsson L (2012) Role of sepsis in the development of limb muscle weakness in a porcine intensive care unit model. *Physiol Genom* 44(18): 865–877.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00031.2012>
12. Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Mi-Mi L, Gregorio CC (2017) Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr Physiol* 7(3): 891–944.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160033>
13. Capetanaki Y, Papathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M (2015) Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Current Opin Cell Biol* 32: 113–120.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.01.004>
14. Aweida D, Rudesky I, Volodin A, Shimko E, Cohen S (2018) GSK3-beta promotes calpain-1-mediated desmin filament depolymerization and myofibril loss in atrophy. *J Cell Biol* 217(10): 3698–3714.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201802018>
15. Mirzoev TM, Sharlo KA, Shenkman BS (2021) The Role of GSK-3beta in the Regulation of Protein Turnover, Myosin Phenotype, and Oxidative Capacity in Skeletal Muscle under Disuse

- Conditions. *Int J Mol Sci* 22(10): 508.
<https://doi.org/10.3390/ijms22105081>
16. *Cohen S* (2020) Role of calpains in promoting desmin filaments depolymerization and muscle atrophy. *Bioch Biophys Acta Mol Cell Res* 1867(10): 118788
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118788>
17. *Helliwell TR, Wilkinson A, Griffiths RD, McClelland P, Palmer TE, Bone JM* (1998) Muscle fibre atrophy in critically ill patients is associated with the loss of myosin filaments and the presence of lysosomal enzymes and ubiquitin. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(6): 507–517.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.1998.00144.x>
18. *Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schroder R* (2013) Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 125(1): 47–75.
<https://doi.org/10.1007/s00401-012-1057-6>
19. *Shah F, Franklin KA, Holmlund T, Levring Jaghagen E, Berggren D, Forsgren S, Stal P* (2019) Desmin and dystrophin abnormalities in upper airway muscles of snorers and patients with sleep apnea. *Respir Res* 20(1): 31.
<https://doi.org/10.1186/s12931-019-0999-9>
20. *Carlsson L, Thornell LE* (2001) Desmin-related myopathies in mice and man. *Acta Physiol Scand* 171(3): 341–348.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2001.00837.x>
21. *Kisselev AF, Goldberg AL* (2001) Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8(8): 739–758.
[https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(01\)00056-4](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(01)00056-4)
22. *Bodine SC, Baehr LM* (2014) Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 307(6): E469–E484.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>
23. *Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL* (2001) Atrogen-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14440–14445.
<https://doi.org/10.1073/pnas.251541198>
24. *Baehr LM, Hughes DC, Lynch SA, Van Haver D, Maia TM, Marshall AG, Radoshevich L, Impens F, Waddell DS, Bodine SC* (2021) Identification of the MuRF1 Skeletal Muscle Ubiquitylome Through Quantitative Proteomics. *Function* 2(4): zqab029.
<https://doi.org/10.1093/function/zqab029>
25. *Lokireddy S, Wijesoma IW, Sze SK, McFarlane C, Kambadur R, Sharma M* (2012) Identification of atrogen-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol* 303(5): C512–C529.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00402.2011>
26. *Cohen S, Zhai B, Gygi SP, Goldberg AL* (2012) Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J Cell Biol* 198(4): 575–589.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201110067>
27. *Akkad H, Corpeno R, Larsson L* (2014) Masseter muscle myofibrillar protein synthesis and degradation in an experimental critical illness myopathy model. *PloS One* 9(4): e92622.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092622>
28. *Kachaeva EV, Shenkman BS* (2012) Various jobs of proteolytic enzymes in skeletal muscle during unloading: facts and speculations. *J Biomed Biotechnol* 2012: 493618.
<https://doi.org/10.1155/2012/493618>
29. *Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL* (2004) Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J: Official Publicat Federat Am Soc Exp Biol* 18(9): 1025–1027.
<https://doi.org/10.1096/fj.03-1228fje>
30. *de Boer MD, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, Maffulli N, Movin T, Narici MV, Rennie MJ* (2007) The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J Physiol* 585(Pt 1): 241–251.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142828>

Desmin Degradation in the Skeletal Muscle of Patients with Chronic Critical Illness

**S. A. Tyganov^{a,*}, K. A. Zaripova^a, O. V. Turtikova^a, E. N. Skiteva^{a,b}, S. P. Belova^a,
Yu. M. Zabrodskaya^b, S. A. Kondratiev^c, E. A. Kondratieva^{b,d},
A. N. Kondratiev^b, and B. S. Shenkman^a**

^a*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Department of Anesthesiology and Intensive Care of the Russian National Institute of Chemistry, Saint Petersburg, Russia*

^c*AIMIS Healthcare Group, Clinic Athonitissa, Limassol, Cyprus*

^d*Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: s.a.tyganov@gmail.com*

Chronically critically ill patients lose a significant amount of muscle mass during their stay in the intensive care unit, which can have long-term detrimental consequences. This, among other factors, leads to the degradation of the muscle cytoskeleton's integrity, and at present there are no comprehensive studies that describe the mechanisms behind the development of this process. The purpose of this study was to investigate the signaling processes that contribute to the degradation of desmin in patients with critical illness myopathy (CIM). Incisional muscle biopsies were taken from the soleus muscle from 6 patients undergoing treatment at the A.L. Polenov Russian Research Institute - branch of the Almazov National Medical Research Center, with chronic impairment of consciousness (lasting at least 2 months). Muscle biopsies taken from healthy men using a needle biopsy technique were used as controls. Biopsies were frozen in liquid nitrogen for subsequent Western blot and PCR analysis, as well as immunohistochemical studies. The analysis showed that fibers with an altered histological pattern of desmin were visually identified in 4 out of 6 patients studied. We also observed a significant decrease in desmin content by 69% and a 24% decrease in its mRNA content in patients with CIM. Desmin breakdown may be associated with increased calpain activity and activation of the ubiquitin-proteasome system. In this study, the content of calpain-1 increased under conditions of CIM at the protein level, but remained unchanged at the mRNA level. We observed changes in GSK3- β (Ser9) phosphorylation, which is a crucial step in the depolymerization of desmin filaments by calpain-1. A study on ubiquitin ligases revealed a significant 155% increase in the expression of Trim32, along with a decrease in the expression of Atrogin1 and MuRF1. Thus, in this study, we observed a decrease in desmin content under conditions of CIM. The breakdown of desmin may be due to increased phosphorylation by GSK3 β and subsequent cleavage by calpain-1. In addition, we observed an increase in the expression of the E3 ubiquitin ligase Trim32, the activity of which, according to literature, also increases after phosphorylation of desmin.

Keywords: chronic disorder of consciousness, chronic critical illness, skeletal muscle, desmin, critical illness myopathy, ubiquitin ligases, proteolysis