

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 110 № 4
апрель
2024



НАУКА

— 1727 —



СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Взаимодействие эндокринной и экзокринной частей поджелудочной железы <i>А. Мостафа, Е. А. Ганцова, О. В. Серова, Т. Мохаммад, И. Е. Деев</i>	515
Транскрипционный фактор NF-κB: участие в нейроиммуноэндокринных механизмах заболеваний дыхательной системы <i>Ю. И. Белова, Е. С. Миронова, Т. С. Зубарева, И. М. Кветной, П. К. Яблонский</i>	527
Кислородзависимые аспекты действия аспросина <i>В. В. Зинчук, Д. Ш. О. Аль-Джебур</i>	547

Экспериментальные статьи

Инсулиновый сигналинг в нейронах туберальной области гипоталамуса крыс при старении <i>П. А. Анфимова, В. В. Порсева, Л. Г. Панкрашева, Е. С. Ширина, П. М. Маслюков</i>	561
Влияние эстрадиола на углеводно-жировой обмен и активность системы FGF21 у самок мышей C57BL/6 при краткосрочном содержании на диете кафетерия <i>Т. В. Яковлева, А. Ю. Казанцева, К. Ю. Мамонтова, Н. М. Бажан</i>	573
Эффективность курсового применения метформина в комбинации с интраназально вводимым инсулином для лечения крыс с ожирением, вызванным «кафетерий-диетой» <i>К. В. Деркач, И. И. Зорина, А. О. Шпаков</i>	590
Особенности отражения эмоций в характеристиках речи и мимике детей 7–8 лет <i>Е. А. Клешиев, О. В. Фролова, Е. Е. Ляко</i>	605
Генотоксический стресс как триггер эндотелиальной дисфункции у крыс линии wistar: результаты молекулярно-генетического исследования <i>М. Ю. Синицкий, А. В. Синицкая, М. В. Хуторная, М. А. Асанов, Д. К. Шишкова, А. О. Поддубняк, А. В. Понасенко</i>	624

CONTENTS

Reviews

Interaction of the Endocrine and Exocrine Parts of the Pancreas <i>A. Mostafa, E. A. Gantsova, O. V. Serova, T. Mohammad, and I. E. Deyev</i>	515
Transcription Factor NF- κ B: Role and Significance in the Neuroimmunoendocrine Regulation of Respiratory Function in Normal Conditions and in Lung Pathology <i>Yu. I. Belova, E. S. Mironova, T. S. Zubareva, I. M. Kvetnoy, and P. K. Yablonsky</i>	527
Oxygen-Dependent Aspects of The Action of Asprosyn <i>V. V. Zinchuk and J. S. O. Al-Jebur</i>	547

Experimental articles

Insulin Signaling in Neurons of The Tuberal Area of The Hypothalamus of Rats During Aging <i>P. A. Anfimova, V. V. Porseva, L. G. Pankrasheva, E. S. Shirina, and P. M. Masliukov</i>	561
Effect Of Estradiol on Carbohydrate-Fat Metabolism and FGF21 System Activity in Female C57BL/6 Mice with Short-Term Consumption of The Cafeteria Diet <i>T. V. Jakovleva, A. Yu. Kazantseva, K. Yu. Mamontova, and N. M. Bazhan</i>	573
Effectiveness Of Course Use of Metformin and Its Combination with Intranasal Insulin for Treatment of Rats With "Cafeteria Diet"-Induced Obesity <i>K. V. Derkach, I. I. Zorina, and A. O. Shpakov</i>	590
Peculiarities Of the Emotions Manifestation By 7–8 Old Children in Speech and Facial Expressions <i>E. A. Kleshnev, O. V. Frolova, and E. E. Lyakso</i>	605
Genotoxic Stress Is a Trigger of Endothelial Dysfunction in Wistar Rats: Results of a Molecular Genetic Study <i>M. Yu. Sinitsky, A. V. Sinitskaya, M. V. Khutornaya, M. A. Asanov, D. K. Shishkova, A. O. Poddubnyak, and A. V. Ponasenko</i>	624

ОБЗОРЫ

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭНДОКРИННОЙ И ЭКЗОКРИННОЙ ЧАСТЕЙ
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

© 2024 г. А. Мостафа¹, Е. А. Ганцова², О. В. Серова³, Т. Мохаммад⁴,
И. Е. Деев^{3,*}

¹Исследовательский центр GIGA, Льежский университет, Льеж, Бельгия

²Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины,

Российский Университет Дружбы Народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Россия

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, Россия

⁴Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Москва, Россия

*E-mail: deyevie@gmail.com

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После доработки 19.12.2023 г.

Принята к публикации 25.12.2023 г.

Поджелудочная железа играет ключевую роль в эндокринной системе животных, а также в переваривании и всасывании питательных веществ. Экзокринная и эндокринная части поджелудочной железы структурно отделены друг от друга, однако многочисленные исследования предполагают наличие анатомической и функциональной связи между этими частями. Раньше этим взаимодействиям уделялось меньше внимания, но в настоящее время поджелудочная железа рассматривается как единый орган, состоящий из функционально связанных компонентов, который координирует эндокринные и экзокринные ответы. В нашем обзоре рассмотрены последние данные, указывающие о функциональной связи и взаимном влиянии эндокринного и экзокринного отделов поджелудочной железы. Кроме того, мы также рассмотрим влияние инфекции SARS-CoV-2 на функционирование поджелудочной железы.

Ключевые слова: поджелудочная железа, гормон, инсулин, щелочной pH, SARS-CoV-2

DOI: 10.31857/S0869813924040019, **EDN:** COMRXL

ВВЕДЕНИЕ

Поджелудочная железа – орган, расположенный в нижнем отделе брюшной полости за желудком. Он разделен на головку, тело и хвост и расположен позади желудка в левой верхней части брюшной полости. Высвобождая различные пищеварительные ферменты и гормоны, поджелудочная железа регулирует переваривание макронутриентов и, таким образом, метаболизм/энергетический гомеостаз. Она отвечает за преобразование пищи, которую мы потребляем, в энергию для наших клеток.

У поджелудочной железы есть две основные функции: экзокринная, отвечающая за пищеварение, и эндокринная, регулирующая, в частности, уровень сахара в крови. Инсулин, глюкагон, соматостатин и амилин являются основными гормонами поджелудочной железы, влияющими на уровень глюкозы в крови. Механизм действия глюкагона обусловлен его связыванием с глюкагоновыми рецепторами клеток печени. Это приводит к повышению опосредованной Gs-белком активности аденилатциклазы и увеличению образования цАМФ. Результатом является усиление катаболизма депонированного в печени гликогена (гликогенолиза). Глюкагон для гепатоцитов служит внешним сигналом о необходимости выделения в кровь глюкозы за счет распада гликогена (гликогенолиза) или синтеза глюкозы из других веществ — глюконеогенеза. Таким образом, глюкагон в печени, стимулируя распад гликогена, способствует поддержанию глюкозы в крови на постоянном уровне. Метаболическая функция амилина заключается в ингибировании повышения уровня глюкозы в плазме крови. Таким образом, амилин действует как синергетический партнер инсулина, вместе с которым он секретируется β -клетками поджелудочной железы в ответ на прием пищи. Общий эффект заключается в замедлении скорости повышения концентрации глюкозы в крови после еды. Это достигается за счет ингибирования пищеварительной секреции (желудочной кислоты, ферментов поджелудочной железы и выброса желчи) и, как следствие, снижения потребления пищи. Соматостатин является ингибирующим гормоном, в частности, он ингибирует секрецию инсулина и глюкагона. Соматостатин тормозит всасывание в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, функцией соматостатина является продление времени поступления питательных веществ, в том числе глюкозы в кровотоки.

Основная функция инсулина — регулирование углеводного обмена, в частности, утилизация глюкозы в организме. Инсулин увеличивает проницаемость плазматических мембран для глюкозы и других макронутриентов, активирует ключевые ферменты гликолиза, стимулирует образование в печени и мышцах из глюкозы гликогена, усиливает синтез жиров и белков. Кроме того, инсулин подавляет активность ферментов, расщепляющих гликоген и жиры, то есть помимо анаболического действия, инсулин обладает также и антикатаболическим эффектом. Человеческому организму требуется довольно ограниченный диапазон уровня глюкозы в крови. Нормальный диапазон значений концентрации глюкозы в крови составляет от 70 до 130 мг/дл (от 3.9 до 7.1 ммоль/л). Эндокринные гормоны поджелудочной железы в основном отвечают за регуляцию уровня глюкозы в крови, регулируя баланс посредством отрицательной обратной связи.

На экзокринную часть приходится более 90% общего объема поджелудочной железы. Она состоит из ацинусов, которые представляют собой скопления клеток, секретирующих экзокринные ферменты поджелудочной железы, такие как липазы, протеазы и амилазы, и системы вставочных протоков, которые транспортируют эти ферменты в проксимальный отдел двенадцатиперстной кишки, чтобы помочь расщеплять жиры, белки и углеводы для всасывания. Гормоны глюкагон, инсулин и соматостатин секретируются в кровотоки островками Лангерганса (α -, β - и δ -клетками соответственно) и обеспечивают эндокринную функцию поджелудочной железы [1]. Панкреатический полипептид (PP), секретируемый PP-клетками, и грелин, который продуцируется ϵ -клетками, также входят в число гормонов, продуцируемых островками поджелудочной железы [1]. Экзокринная секреция поджелудочной железы строго контролируется нейроэндокринной системой, которая анатомически и физиологически связана с экзокринной частью поджелудочной железы [2].

Большая часть биологических исследований поджелудочной железы сосредоточена на эндокринной системе, что обусловлено желанием найти методы лечения такого заболевания, как сахарный диабет. Однако в последние годы растет количество работ, посвященных изучению функционирования экзокринной части поджелудочной

железы. Эти исследования подчеркивают критическую роль ацинарных и протоковых клеток в патологии поджелудочной железы, а также помогают понять, как клетки экзокринной части могут служить полезными источниками для образования β -клеток островков Лангерганса [3].

АЦИНАРНО-ПРОТОКОВЫЕ ЧАСТИ ЭКЗОКРИННОЙ ЧАСТИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ацинус поджелудочной железы состоит из клеток пирамидальной формы с многочисленными секреторными гранулами. Соединительная ткань с кровеносными сосудами, лимфой, нервами и выводными протоками отделяет ацинусы поджелудочной железы друг от друга. Ацинарные клетки выделяют комбинацию пищеварительных ферментов с небольшим объемом жидкости, богатой ионами Na^+ , Cl^- и H^+ . Эпителиальные клетки, выстилающие протоки поджелудочной железы, секретируют ионы Cl^- и HCO_3^- с большим объемом жидкости, что делает pH в просвете двенадцатиперстной кишки слабощелочным (повышение pH до 8.5), обеспечивая тем самым оптимальную среду для ферментативной активности [4]. Маленькие вставочные протоки соединяют просвет ацинусов с внутридольковыми протоками внутри субъединиц поджелудочной железы, продвигаясь через более крупные междольковые протоки, и в итоге вливаются в главный проток поджелудочной железы, который встречается с желчным протоком, образуя общий желчный проток (рис. 1). Пищеварительные ферменты, секретируемые ацинарными клетками, включают более 10 различных протеаз, а также липазы, рибонуклеазы, амилазы и гидролазы. Протеолитические ферменты высвобождаются в неактивной форме, чтобы избежать самопереваривания поджелудочной железы. Каскад физиологической активации начинается в двенадцатиперстной кишке, где кишечная энтеропептидаза преобразует трипсиноген в активную форму фермента – трипсин. Трипсин затем активирует другие проферменты [4].

ЭНДОКРИННАЯ ЧАСТЬ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Островки Лангерганса состоят из скоплений эндокринных клеток, которые разбросаны по экзокринному эпителию между ацинусами и протоковыми структурами. Типы эндокринных клеток островков Лангерганса поджелудочной железы имеют четко выраженное пространственное расположение. Эта структура необходима для межклеточной коммуникации и секреции гормонов. Инсулин-секретирующие β -клетки составляют большую часть островка Лангерганса у мышей, тогда как α -клетки, δ -клетки и PP-клетки составляют периферию островка. Архитектура островков более сложна у людей и других приматов, но она по-прежнему соответствует общей структуре в виде β -клеток, окруженных оболочками из α , δ и других типов эндокринных клеток [5]. У человека островки примерно на 30% состоят из α -клеток, секретирующих глюкагон, и на 60% из β -клеток, секретирующих инсулин и аминин, а остальные 10% состоят из δ -клеток (секретирующих соматостатин), γ - или PP-клеток (продуцирующих полипептид поджелудочной железы) и ϵ -клеток (продуцирующих грелин) [1].

Альфа-клетки, продуцирующие глюкагон, изучены гораздо меньше, чем β -клетки, продуцирующие инсулин. Состояние натошак характеризуется наличием глюкагона – гормона, противодействующего инсулину. Согласованная регуляция секреции глюкагона и инсулина является основным механизмом контроля уровня глюкозы в крови. Основная роль контррегуляторной реакции заключается в предотвращении гипогликемии, именно эта реакция затруднена при диабете. При сахарном диабете 2-го типа (СД2) α -клетки производят больше глюкагона в ответ на аминокислоты и неэффективно ингибируют выработку глюкагона из-за высокого уровня глюкозы в плазме [6].

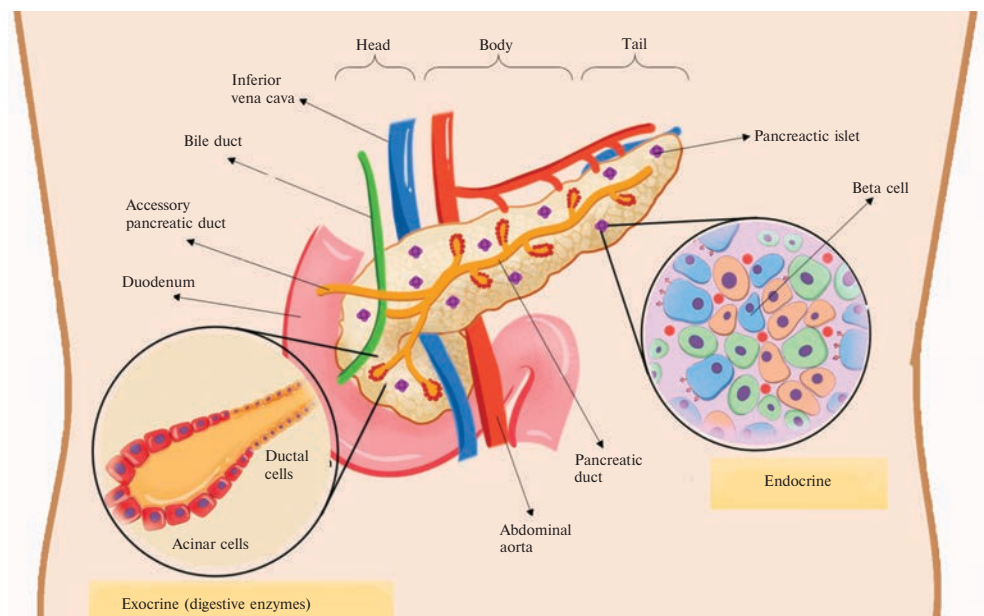


Рис. 1. Эндокринная и экзокринная части поджелудочной железы. Анатомия поджелудочной железы включает как экзокринную, так и эндокринную части: экзокринные клетки секретируют пищеварительные ферменты и поджелудочный сок в тонкую кишку, а эндокринные клетки выделяют в кровоток такие гормоны, как инсулин и глюкагон, для регулирования уровня сахара в крови. Эта двойная функция поджелудочной железы необходима для поддержания оптимального обмена веществ и правильного пищеварения в организме.

Участие регуляции функции α -клеток в патофизиологии СД2 в настоящее время широко изучается.

Молекула инсулина образована двумя полипептидными цепями А и В, соединенными дисульфидными связями и содержащими 51 аминокислотный остаток. Инсулин оказывает значительное гипогликемическое действие. Этот гормон необходим для клеточного усвоения пищи и, следовательно, для выживания организма. Одним из ключевых медицинских достижений двадцатого века было его выделение и эффективное клиническое использование в 1923 г. Инсулин, как и большинство других пептидных гормонов, производится из молекулы-предшественника, называемой проинсулином, которая затем расщепляется на 3 части: цепи А и В с образованием биологически активной молекулы инсулина, а также цепи С (соединительный пептид), который высвобождается в молярном соотношении 1:1 с инсулином. Из-за равных количеств секреции инсулина и С-пептида измерения высвобождения иммунореактивного С-пептида оказались очень ценным независимым показателем скорости секреции инсулина *in vivo* у людей, особенно у людей с диабетом, получающих инъекции инсулина. Измерение концентрации С-пептида в крови используется при диабете для оценки выработки инсулина поджелудочной железой. С-пептид высвобождается одновременно с инсулином, но имеет более длительный период полураспада в крови, что делает его полезным показателем секреции эндогенного инсулина. Это может помочь отличить диабет 1-го и 2-го типа и оценивать необходимость инсулинотерапии. Ассоциированный с островками полипептид (IAPP, широко известный как амилин) представляет собой пептид из 37 аминокислот, также секретируемый β -клетками. Молекулы IAPP могут полимеризоваться при патологических обстоятельствах и образовывать массивные внутриостровковые отложения амилоида, которые часто встречаются при диабете 2-го типа и инсулиноме.

Другими клетками, обнаруженными в островках Лангерганса, являются клетки D (или δ), которые выделяют соматостатин (ранее называвшийся фактором, ингибирующим высвобождение соматотропина), клетки PP, которые производят наименее изученный из островковых гормонов (гормон PP) и последний тип клеток — это ϵ - или грелин-продуцирующие клетки. Грелин был первоначально выделен из желудка крысы, а затем обнаружен в определенном типе клеток островков Лангерганса. Считается, что этот гормон играет роль в высвобождении гормона роста, метаболической регуляции и энергетическом балансе островковых клеток [7], хотя его функция в этих клетках до сих пор малоизучена.

Предполагается, что клеточная архитектура островков Лангерганса имеет решающее значение для обеспечения их соответствующей функции. Ожирение и диабет у мышей и людей связаны с нарушением структуры этих островков [8]. Гомеостатическая регуляция микроокружения островков необходима для нормальной функции островков, особенно для секреции инсулина. Известно, что в поддержании гомеостаза островков и функции β -клеток ключевую роль играют эндокринные клетки, иммунные клетки, нейроны и эндотелиальные клетки сосудов [9].

КАК ВЛИЯЮТ ДРУГ НА ДРУГА ЭНДОКРИННАЯ И ЭКЗОКРИННАЯ ЧАСТИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ?

Во многих гистологических исследованиях как эндокринная, так и экзокринная части поджелудочной железы рассматривались как отдельные образования, и не уделялось внимания взаимодействиям между ними, только в последние годы ученые начали исследовать механизмы взаимодействия между островками Лангерганса, протоками и ацинусами. В настоящее время поджелудочная железа считается интегрированным органом, состоящим из трех функционально связанных компонентов, которые координируют эндокринные и экзокринные функции [10].

Обе части поджелудочной железы развиваются одинаково с точки зрения эмбриологии, когда эпителиальные клетки инвагинируют в соединительную ткань, подстилающую эпителиальную мембрану. Первоначальные инвагинации экзокринной части сохраняются в виде протоков и ацинарной системы, однако связи островков с эпителиальной мембраной утрачиваются. В результате секреторные продукты островковых тканей высвобождаются в кровоток в виде гормонов [11]. Островки Лангерганса, когда они полностью развиты, отделяются от окружающей ацинарной ткани тонким слоем ретикулярных волокон, не имеющих связи с протоками. Однако в поджелудочной железе человека внутри островков Лангерганса были обнаружены небольшие протоки поджелудочной железы и ацинарные клетки [12].

Более того, было показано, что IEI (islet-exocrine interface, островково-экзокринный интерфейс), который является важнейшей анатомической и функциональной областью, обеспечивает межклеточную связь между эндокринными островками поджелудочной железы и экзокринными ацинарными клетками. Десмосомы и адгезивные соединения недавно были обнаружены между островковыми и ацинарными клетками в IEI [11]. На экспериментальных животных и у пациентов было обнаружено, что потеря клеточной паракринной связи и фиброз, в результате которого происходит перестройка внеклеточного матрикса, могут привести к дисфункции инсулино-ацинарно-протоковой-инкретиновой гормональной оси кишечника, что приводит к недостаточности поджелудочной железы и дефициту глюкагоноподобных пептидов, которые встречаются в преддиабетном состоянии и СД2 [11].

В другом исследовании пытались определить, усиливает ли восстановление регуляторных эффектов, опосредованных эпителиальными клетками протоков, *in vitro* долгосрочную функцию β -клеток. Было обнаружено, что снижение массы β -клеток и секреции инсулина, наблюдаемое в островках человека при выделении и культивиро-

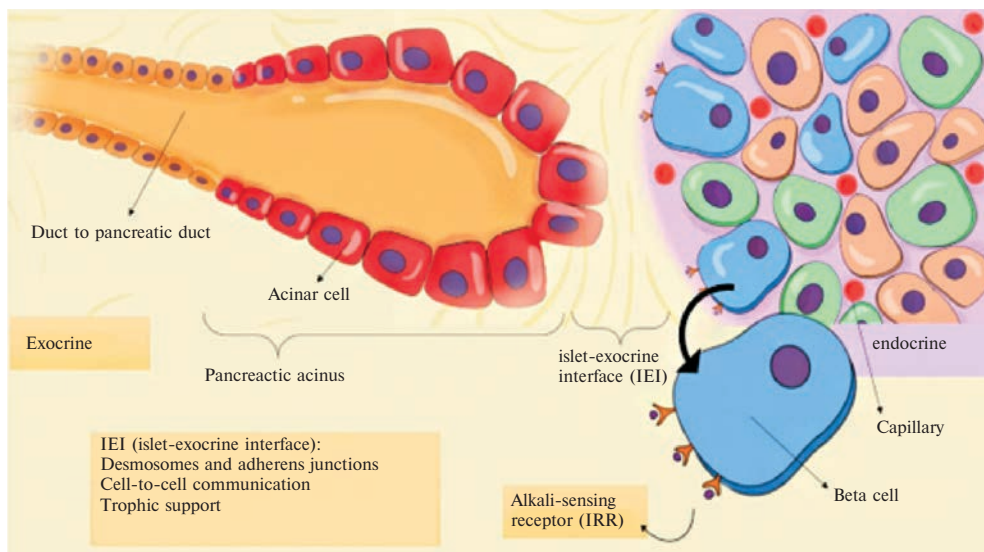


Рис. 2. Механизмы взаимодействия островков Лангерганса, клеток протоков и ацинусов. В то время как экзокринные клетки секретируют поджелудочный сок вместе с ферментами в тонкую кишку, эндокринные клетки выделяют в кровоток такие гормоны, как инсулин и глюкагон. Эти гормоны жизненно важны для регулирования уровня сахара в крови и работают в координации с пищеварительными ферментами, вырабатываемыми экзокринными клетками, чтобы обеспечить правильное пищеварение и всасывание питательных веществ. Взаимодействия этих частей между собой обеспечивает регулирование этих процессов.

вании, обусловлено потерей трофической поддержки, обеспечиваемой окружающими неэндокринными клетками поджелудочной железы. Эти находки подтверждают, что протоковые эпителиальные клетки выполняют функцию поддержки жизнеспособности островков [13].

Кроме того, было обнаружено, что за счет высвобождения цитокинов и факторов роста протоковые и ацинарные клетки оказывают влияние на физиологию эндокринных островковых клеток [14]. Было показано, что повышенная экспрессия гастрина и TGF- α в клетках протоков играет роль в пролиферации и дифференцировке островковых клеток из клеток-предшественников внутри эпителия протоков [15, 16].

Как известно, одна из основных функций поджелудочной железы – секреция слабощелочного (pH 8.0–8.5) сока в кишечник. Согласно последним данным, система протоков поджелудочной железы, содержащая слабощелочной сок, может быть связана с эндокринными клетками островков поджелудочной железы [17]. Также было обнаружено, что рецептор, чувствительный к щелочи, который называется IRR (“insulin receptor related receptor”, рецептор, подобный рецептору инсулина), экспрессируется на клеточной поверхности β -клеток поджелудочной железы. Этот рецептор был открыт как гомолог инсулинового рецептора (IR) и считался орфанным рецептором, поскольку он не реагирует на инсулин или другие агонисты инсулиновых рецепторов [18]. Согласно исследованию, проведенному на линии клеток поджелудочной железы Min6, активация IRR щелочью может быть частью обратной связи между экзокринной и эндокринной системами поджелудочной железы. Подщелачивание поджелудочного сока вызывает активацию рецепторной тирозинкиназы IRR, что, в свою очередь, приводит к активации внутриклеточного сигнального белка IRS-1 и изменению в актиновом цитоскелете β -клеток, что потенциально может влиять на способность β -клеток секретировать гормоны [17] (рис. 2).

Также было обнаружено, что эндокринные и неэндокринные клетки поджелудочной железы образуют β -клетки путем трансдифференцировки (т. е. преобразования из другого, полностью дифференцированного типа клеток). Несколько групп исследователей сообщили о создании *ex vivo* клеток, подобных β -клеткам из ацинарной ткани человека с использованием различных экспериментальных методов [19].

ИНФЕКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РЕЗУЛЬТАТЕ ЭПИДЕМИИ COVID-19

Поскольку недавно мир пережил пандемию COVID-19, важной задачей стало выяснить, как этот вирус влияет на каждый орган нашего организма и каковы его долгосрочные последствия. Со временем появляется все больше сообщений о его системном влиянии на наш организм.

Сначала считалось, что инфекция COVID-19 поражает только верхние дыхательные пути, затем было обнаружено, что вирус способен поражать практически все системы. Для проникновения в клетку SARS-CoV-2 связывается с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2), представляющим собой трансмембранный белок, а также использует сериновую протеазу TMPRSS2 [20, 21]. Помимо дыхательной системы, белок ACE2 был обнаружен в желудочно-кишечном тракте, в почках, поджелудочной железе и желчном пузыре [22, 23]. Хотя большинство пациентов испытывают респираторные симптомы, включая кашель, одышку и затруднение дыхания, было несколько сообщений о желудочно-кишечных симптомах, таких как диарея, тошнота, рвота и боль в животе, которые могут возникать даже при отсутствии респираторных симптомов [24–27].

Повышенный уровень ферментов поджелудочной железы был обнаружен примерно у 20–30% госпитализированных пациентов с COVID-19 и, как было показано, связан с тяжестью инфекции COVID-19 и худшими клиническими исходами [28–30]. Кроме того, сахарный диабет или гипергликемический стресс в настоящее время признаны факторами риска тяжелых исходов COVID-19, включая госпитализацию и смерть [31, 32]. Предполагается, что COVID-19 связан с более высоким риском впервые возникшей гипергликемии и диабета как у взрослых, так и у детей [33–35]. Хотя точные механизмы возникновения диабета у людей с COVID-19 неизвестны, предполагается, что в нем задействован ряд сложных взаимосвязанных процессов, включая стресс-индуцированную гипергликемию, стероид-индуцированную гипергликемию и прямое или косвенное воздействие SARS-CoV-2 на β -клетки [36].

Чтобы выяснить механизмы дисфункции поджелудочной железы, вызванной SARS-CoV-2, несколько групп исследователей попытались локализовать ACE2 и TMPRSS2 в поджелудочной железе, но данные до сих пор противоречивы. Белок ACE2 был обнаружен в поджелудочной железе преимущественно в протоковых и микрососудистых структурах без явной экспрессии в β -клетках [37, 38]. Другие авторы сообщили об экспрессии ACE2 поджелудочной железы в микроциркуляторном русле, а также в островках поджелудочной железы человека, преимущественно в β -клетках [39]. Müller и соавт. обнаружили сильно выраженную экспрессию ACE2 в эндотелиальных и протоковых клетках, а также умеренную экспрессию в эндокринных клетках (в основном в β -клетках). Аналогичным образом TMPRSS2 был обнаружен в эндокринном отделе и в некоторых протоках [40]. Однако считается, что проникновение SARS-CoV-2 опосредовано не только ACE2, поскольку не только ACE2-экспрессирующие клетки были положительными на вирусные частицы в поджелудочной железе [41]. Нейропилин 1 (NRP1) был предложен в качестве альтернативного рецептора для проникновения вируса SARS-CoV-2. NRP-1 является очень важным корецептором для проникновения SARS-CoV-2 в клетку-хозяина. Было также замечено, что присутствие NRP-1 на поверхности клетки-хозяина облегчает распространение инфекции SARS-

CoV-2 и может способствовать проникновению вируса среди прочего в мозг. Более того, похоже, что использование ингибиторов NRP-1 или VEGF-A/NRP-1 следует рассматривать как потенциальную анальгетическую и противовирусную терапию. Значение NRP-1 при SARS-CoV-2 необходимо дополнительно изучить, чтобы подтвердить его роль в коронавирусной инфекции. [42].

Также было показано, что SARS-CoV-2 реплицируется в изолированных островках поджелудочной железы человека, преимущественно в β -клетках [43], вызывая субклеточные и функциональные изменения, а также нарушение регуляции выработки и секреции инсулина. SARS-CoV-2 также был обнаружен в образцах аутопсии поджелудочной железы (7 из 9 пациентов умерли от осложнений COVID-19), а окрашивание нуклеокапсидного белка (NP) SARS-CoV-2 было обнаружено в β -клетках у 4 из 7 пациентов [43]. Steenblock и соавт. также наблюдали NP SARS-CoV-2 в эндокринной и экзокринной частях поджелудочной железы пациентов с COVID-19 и предположили, что SARS-CoV-2 может вызывать инфильтрацию иммунных клеток и некроптолитическую гибель клеток в островках Лангерганса [41]. Было обнаружено, что при инфекции SARS-CoV-2 β -клетки подвергаются трансдифференцировке, что приводит к снижению экспрессии инсулина и повышению экспрессии глюкагона и трипсина-1 [44]. Предполагается, что трансдифференцировка β -клеток, индуцированная SARS-CoV-2, опосредуется через eIF2 путь.

Исследования долгосрочного COVID-19 показывают, что даже после острой фазы выздоровевшие пациенты имеют повышенный риск развития диабета [45], а выздоровевшие пациенты с диабетом, как предполагается, чаще страдают от долгосрочных последствий COVID-19 по сравнению с людьми без диабета [46, 47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обычно поджелудочную железу разделяют на две дискретные системы: эндокринную и экзокринную. Эндокринная часть состоит из островков Лангерганса, отдельных единиц эндокринных клеток и их зачатков, тогда как экзокринная часть состоит из ацинарных клеток и системы протоков. Экзокринная часть выделяет слабощелочной сок с пищеварительными ферментами, направленными в двенадцатиперстную кишку, а эндокринная вырабатывает гормоны и высвобождает их в кровь. Однако недавние исследования показывают, что эти два объекта поджелудочной железы имеют сильную взаимную связь между собой [10]. Всем специалистам, занимающимся проблемами поджелудочной железы, необходимо иметь глубокое понимание функции обеих частей поджелудочной железы, а также анатомических и функциональных взаимосвязей между ними, чтобы разрабатывать новые методы лечения с новыми биологическими мишенями для лечения, в частности.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Написание и редактирование манускрипта (А. М., Е. А. Г., О. В. С., Т. М., И. Е. Д.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда, грант № 23-25-00298. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования на человеке или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Da Silva Xavier G* (2018) The Cells of the Islets of Langerhans. *J Clin Med* 7(3): 54.
<https://doi.org/10.3390/JCM7030054>
2. *Pandiri AR* (2014) Overview of exocrine pancreatic pathobiology. *Toxicol Pathol* 42: 207–216.
<https://doi.org/10.1177/0192623313509907>
3. *Zhou Q, Melton DA* (2018) Pancreas regeneration. *Nature* 557: 351–358.
<https://doi.org/10.1038/S41586-018-0088-0>
4. *Hegyi P, Petersen OH* (2013) The exocrine pancreas: the acinar-ductal tango in physiology and pathophysiology. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 165: 1–30.
https://doi.org/10.1007/112_2013_14
5. *Bonner-Weir S, Sullivan BA, Weir GC* (2015) Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All. *J Histochem Cytochem* 63: 604–612.
<https://doi.org/10.1369/0022155415570969>
6. *Dunning BE, Gerich JE* (2007) The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* 28: 253–283.
<https://doi.org/10.1210/ER.2006-0026>
7. *Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F* (2002) The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107: 63–69.
[https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00067-8)
8. *Gilbert JM, Adams MT, Sharon N, Jayaraman H, Blum B* (2021) Morphogenesis of the Islets of Langerhans Is Guided by Extraendocrine Slit2 and Slit3 Signals. *Mol Cell Biol* 41.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00451-20>
9. *Guo J, Fu W* (2020) Immune regulation of islet homeostasis and adaptation. *J Mol Cell Biol* 12: 764–774.
<https://doi.org/10.1093/JMCB/MJAA009>
10. *Bertelli E, Bendayan M* (2005) Association between endocrine pancreas and ductal system. More than an epiphenomenon of endocrine differentiation and development? *J Histochem Cytochem* 53: 1071–1086.
11. *Hayden MR, Patel K, Habibi J, Gupta D, Tekwani SS, Whaley-Connell A, Sowers JR* (2008) Attenuation of endocrine-exocrine pancreatic communication in type 2 diabetes: pancreatic extracellular matrix ultrastructural abnormalities. *J Cardiometab Syndr* 3: 234–243.
<https://doi.org/10.1111/J.1559-4572.2008.00024.X>
12. *Suda K, Hosokawa Y, Kuroda J, Yuminamochi T, Ishii Y, Nakazawa K* (1994) Pancreatic acinar cells in adult human islets of Langerhans. *Pancreas* 9: 563–565.
<https://doi.org/10.1097/00006676-199409000-00004>
13. *Murray HE, Paget MB, Bailey CJ, Downing R* (2009) Sustained insulin secretory response in human islets co-cultured with pancreatic duct-derived epithelial cells within a rotational cell culture system. *Diabetologia* 52: 477–485.
<https://doi.org/10.1007/S00125-008-1247-X>
14. *Piciucchi M, Capurso G, Archibugi L, Delle Fave MM, Capasso M, Delle Fave G* (2015) Exocrine pancreatic insufficiency in diabetic patients: prevalence, mechanisms, and treatment. *Int J Endocrinol* 2015: 595–649.
<https://doi.org/10.1155/2015/595649>
15. *Wang TC, Bonner-Weir S, Oates PS, Chulak M, Simon B, Merlino GT, Schmidt EV, Brand SJ* (1993) Pancreatic gastrin stimulates islet differentiation of transforming growth factor alpha-induced ductular precursor cells. *J Clin Invest* 92: 1349–1356.
<https://doi.org/10.1172/JCI116708>
16. *Wang RN, Klöppel G, Bouwens L* (1995) Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38: 1405–1411.
<https://doi.org/10.1007/BF00400600>
17. *Deyev IE, Popova NV, Serova OV, Zhenilo SV, Regoli M, Bertelli E, Petrenko AG* (2017) Alkaline pH induces IRR-mediated phosphorylation of IRS-1 and actin cytoskeleton remodeling in a pancreatic beta cell line. *Biochimie* 138.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.04.002>
18. *Serova OV, Gantsova EA, Deyev IE, Petrenko AG* (2020) The Value of pH Sensors in Maintaining Homeostasis of the Nervous System. *Russ J Bioorg Chem* 46: 506–519.
<https://doi.org/10.1134/S1068162020040196>
19. *Masini M, Marselli L, Himpe E, Martino L, Bugliani M, Suleiman M, Boggi U, Filipponi F, Occhipinti M, Bouwens L, De Tata V, Marchetti P* (2017) Co-localization of acinar markers and insulin in pancreatic cells of subjects with type 2 diabetes. *PLoS One* 12.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0179398>

20. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181: 271–280.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.052>
21. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F (2020) Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581: 221–224.
<https://doi.org/10.1038/S41586-020-2179-Y>
22. Hikmet F, Mear L, Edvinsson Å, Micke P, Uhlén M, Lindskog C (2020) The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol Syst Biol* 16.
<https://doi.org/10.15252/MSB.20209610>
23. Hamming I, Timens W, Bultuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H (2004) Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 203: 631–637.
<https://doi.org/10.1002/PATH.1570>
24. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, Wang B, Xiang H, Cheng Z, Xiong Y, Zhao Y, Li Y, Wang X, Peng Z (2020) Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 323: 1061–1069.
<https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.1585>
25. Zhan T, Tang Y, Han Z, Zhu Q, Tan J, Liu M, Cai Y, Huang M, Chen X, Cheng X, Deng J, Huang X, Tian X (2021) Clinical Characteristics of 195 Cases of COVID-19 with Gastrointestinal Symptoms COVID-19 with Gastrointestinal Symptoms. *Turk J Gastroenterol* 32: 148–154.
<https://doi.org/10.5152/TJG.2021.20379>
26. Schettino M, Pellegrini L, Picascia D, Saibeni S, Bezzio C, Bini F, Omazzi BF, Devani M, Arena I, Bongiovanni M, Manes G, Della Corte CMR (2021) Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Gastrointestinal Symptoms in Northern Italy: A Single-Center Cohort Study. *Am J Gastroenterol* 116: 306–310.
<https://doi.org/10.14309/AJG.0000000000000965>
27. Tabesh E, Soheilipour M, Sami R, Mansourian M, Tabesh F, Soltaninejad F, Dehghan M, Nikgofar N, Gharavinia A, Ghasemi K, Adibi P (2022) Gastrointestinal manifestations in patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19): Impact on clinical outcomes. *J Res Med Sci* 27: 32.
https://doi.org/10.4103/JRMS.JRMS_641_21
28. Bacaksız F, Ebik B, Ekin N, Kılıç J (2021) Pancreatic damage in COVID-19: Why? How? *Int J Clin Pract* 75.
<https://doi.org/10.1111/IJCP.14692>
29. Yang F, Xu Y, Dong Y, Huang Y, Fu Y, Li T, Sun C, Pandanaboyana S, Windsor JA, Fu D (2022) Prevalence and prognosis of increased pancreatic enzymes in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Pancreatol* 22: 539–546.
<https://doi.org/10.1016/J.PAN.2022.03.014>
30. Kiyak M, Düzenli T (2022) Lipase elevation on admission predicts worse clinical outcomes in patients with COVID-19. *Pancreatol* 22: 665–670.
<https://doi.org/10.1016/J.PAN.2022.04.012>
31. Clausen CL, Leo-Hansen C, Faurholt-Jepsen D, Krogh-Madsen R, Ritz C, Kirk O, Jørgensen HL, Benfield T, Almdal TP, Snorgaard O (2022) Glucometabolic changes influence hospitalization and outcome in patients with COVID-19: An observational cohort study. *Diabetes Res Clin Pract* 187.
<https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2022.109880>
32. Dennis JM, Mateen BA, Sonabend R, Thomas NJ, Patel KA, Hattersley AT, Denaxas S, McGovern AP, Vollmer SJ (2021) Type 2 Diabetes and COVID-19-Related Mortality in the Critical Care Setting: A National Cohort Study in England, March-July 2020. *Diabetes Care* 44: 50–57.
<https://doi.org/10.2337/DC20-1444>
33. Birabakaran M, Kaelber DC, Pettus JH, Smith DM (2022) Risk of new-onset type 2 diabetes in 600 055 people after COVID-19: A cohort study. *Diabetes Obes Metab* 24: 1176–1179.
<https://doi.org/10.1111/DOM.14659>
34. Ambati S, Mihic M, Rosario DC, Sanchez J, Bakar A (2022) New-Onset Type 1 Diabetes in Children With SARS-CoV-2 Infection. *Cureus* 14.
<https://doi.org/10.7759/CUREUS.22790>
35. Montefusco L, Ben Nasr M, D'Addio F, Loretelli C, Rossi A, Pastore I, Daniele G, Abdelsalam A, Maestroni A, Dell'Acqua M, Ippolito E, Assi E, Uselli V, Seelam AJ, Fiorina RM, Chebat E, Morpurgo P, Lunati ME, Bolla AM, Finzi G, Abdi R, Bonventre JV, Rusconi S, Riva A, Corradi D, Santus P, Nebuloni M, Folli F, Zuccotti GV, Galli M, Fiorina P (2021) Acute and long-term disruption of glycometabolic control after SARS-CoV-2 infection. *Nat Metab* 3: 774–785.
<https://doi.org/10.1038/S42255-021-00407-6>

36. *Khunti K, Del Prato S, Mathieu C, Kahn SE, Gabbay RA, Buse JB* (2021) COVID-19, Hyperglycemia, and New-Onset Diabetes. *Diabetes Care* 44: 2645–2655.
<https://doi.org/10.2337/DC21-1318>
37. *Coate KC, Cha J, Shrestha S, Wang W, Gonçalves LM, Almaça J, Kapp ME, Fasolino M, Morgan A, Dai C, Saunders DC, Bottino R, Aramandla R, Jenkins R, Stein R, Kaestner KH, Vahedi G, Brissova M, Powers AC* (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Factors ACE2 and TMPRSS2 Are Expressed in the Microvasculature and Ducts of Human Pancreas but Are Not Enriched in β Cells. *Cell Metab* 32: 1028–1040.
<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.11.006>
38. *Kusmartseva I, Wu W, Syed F, Van Der Heide V, Jorgensen M, Joseph P, Tang X, Candelario-Jalil E, Yang C, Nick H, Harbert JL, Posgai AL, Paulsen JD, Lloyd R, Cechin S, Pugliese A, Campbell-Thompson M, Vander Heide RS, Evans-Molina C, Homann D, Atkinson MA* (2020) Expression of SARS-CoV-2 Entry Factors in the Pancreas of Normal Organ Donors and Individuals with COVID-19. *Cell Metab* 32: 1041–1051.
<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.11.005>
39. *Figani D, Licata G, Brusco N, Nigi L, Grieco GE, Marselli L, Overbergh L, Gysemans C, Colli ML, Marchetti P, Mathieu C, Eizirik DL, Sebastiani G, Dotta F* (2020) SARS-CoV-2 Receptor Angiotensin I-Converting Enzyme Type 2 (ACE2) Is Expressed in Human Pancreatic β -Cells and in the Human Pancreas Microvasculature. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11.
<https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.596898>
40. *Müller JA, Groß R, Conzelmann C, Krüger J, Merle U, Steinhart J, Weil T, Koepke L, Bozzo CP, Read C, Fois G, Eiseler T, Gehrmann J, van Vuuren J, Wessbecher IM, Frick M, Costa IG, Breunig M, Grüner B, Peters L, Schuster M, Liebau S, Seufferlein T, Stenger S, Stenzinger A, MacDonald PE, Kirchhoff F, Sparrer KMJ, Walther P, Lickert H, Barth TFE, Wagner M, Münch J, Heller S, Kleger A* (2021) SARS-CoV-2 infects and replicates in cells of the human endocrine and exocrine pancreas. *Nat Metab* 3: 149–165.
<https://doi.org/10.1038/S42255-021-00347-1>
41. *Steenblock C, Richter S, Berger I, Barovic M, Schmid J, Schubert U, Jarzebska N, von Mässenhausen A, Linkermann A, Schürmann A, Pablik J, Dienemann T, Evert K, Rodionov RN, Semenova NY, Zinserling VA, Gainetdinov RR, Baretton G, Lindemann D, Solimena M, Ludwig B, Bornstein SR* (2021) Viral infiltration of pancreatic islets in patients with COVID-19. *Nat Commun* 12.
<https://doi.org/10.1038/S41467-021-23886-3>
42. *Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, van der Meer F, Kallio K, Kaya T, Anastasina M, Smura T, Levano L, Szirovica L, Tobi A, Kallio-Kokko H, Österlund P, Joensuu M, Meunier FA, Butcher SJ, Winkler MS, Mollenhauer B, Helenius A, Gokce O, Teesalu T, Hepojoki J, Vapalahti O, Stadelmann C, Balistreri G, Simons M* (2020) Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* 370.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABD2985>
43. *Wu CT, Lidsky PV, Xiao Y, Lee IT, Cheng R, Nakayama T, Jiang S, Demeter J, Bevacqua RJ, Chang CA, Whitener RL, Stalder AK, Zhu B, Chen H, Goltsev Y, Tzankov A, Nayak JV, Nolan GP, Matter MS, Andino R, Jackson PK* (2021) SARS-CoV-2 infects human pancreatic β cells and elicits β cell impairment. *Cell Metab* 33: 1565–1576.
<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2021.05.013>
44. *Tang X, Uhl S, Zhang T, Xue D, Li B, Vandana JJ, Acklin JA, Bonnycastle LL, Narisu N, Erdos MR, Bram Y, Chandar V, Chong ACN, Lacko LA, Min Z, Lim JK, Borczuk AC, Xiang J, Naji A, Collins FS, Evans T, Liu C, tenOever BR, Schwartz RE, Chen S* (2021) SARS-CoV-2 infection induces beta cell transdifferentiation. *Cell Metab* 33: 1577–1591.
<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2021.05.015>
45. *Xie Y, Al-Aly Z* (2022) Risks and burdens of incident diabetes in long COVID: a cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 10: 311–321.
[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00044-4](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00044-4)
46. *Steenblock C, Hassanein M, Khan EG, Yaman M, Kamel M, Barbir M, Lorke DE, Rock JA, Everett D, Bejtullah S, Heimerer A, Tahirukaj E, Beqiri P, Bornstein SR* (2022) Diabetes and COVID-19: Short- and Long-Term Consequences. *Horm Metab Res* 54: 503–509.
<https://doi.org/10.1055/A-1878-9566>
47. *Mittal J, Ghosh A, Bhatt SP, Anoop S, Ansari IA, Misra A* (2021) High prevalence of post COVID-19 fatigue in patients with type 2 diabetes: A case-control study. *Diabetes Metab Syndr* 15.
<https://doi.org/10.1016/J.DSX.2021.102302>

Interaction of the Endocrine and Exocrine Parts of the Pancreas

A. Mostafa^a, E. A. Gantsova^b, O. V. Serova^c, T. Mohammad^d, and I. E. Deyev^{c,*}

^a*GIGA Research Centre, Université de Liège, Liège, Belgium*

^b*Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia*

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

^d*Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia*

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

The pancreas plays a key role in the endocrine system of animals and in the digestion and absorption of nutrients. The exocrine and endocrine pancreas are structurally separate from each other, but numerous studies suggest anatomical and functional connections between these parts. Previously, less attention was paid to these interactions, but the pancreas is now viewed as a single organ consisting of functionally related components that coordinates endocrine and exocrine responses. Our review examines the latest data indicating the functional connection and mutual influence of the endocrine and exocrine parts of the pancreas. In addition, we will also look at the impact of SARS-CoV-2 infection on pancreatic function.

Keywords: pancreas, hormone, insulin, alkaline pH, SARS-CoV-2

ОБЗОРЫ

**ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР NF-κB: УЧАСТИЕ
В НЕЙРОИММУНОЭНДОКРИННЫХ МЕХАНИЗМАХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ**

© 2024 г. Ю. И. Белова^{1,2}, Е. С. Миронова^{1,3,*}, Т. С. Зубарева^{1,3}, И. М. Кветной^{1,2},
П. К. Яблонский^{1,2}

¹Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии
Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: katerina.mironova@gerontology.ru

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принята к публикации 25.01.2024 г.

Все более актуальной и многообещающей проблемой современной биомедицины становится выяснение поликомпонентного и многоуровневого механизма единой нейроиммуноэндокринной регуляции физиологических функций. Болезни органов дыхания лидируют в структуре общей заболеваемости населения и остаются одной из самых актуальных проблем современного здравоохранения. Различные факторы риска могут послужить развитию таких патологий, как пневмония, рак легких, астма, хроническая обструктивная болезнь легких и другие. Кроме того, показатели данных заболеваний с каждым годом имеют тенденцию к росту. В связи с этим верификация и изучение сигнальных молекул как факторов, участвующих в нейроиммуноэндокринной регуляции функции легких в норме и патологии, которые, с одной стороны, могут рассматриваться как биомаркеры прогноза заболеваний, а с другой, как потенциальные мишени для таргетной эффективной терапии, является актуальной задачей современной трансляционной биомедицины. Данный обзор литературы посвящен исследованию роли одного из ключевых участников нейроиммуноэндокринных сигнальных взаимоотношений – транскрипционного фактора NF-κB в регуляции дыхательной функции в норме и патогенезе заболеваний легких. Обобщение информации по данной теме является важным и перспективным для понимания молекулярных механизмов возникновения и течения заболеваний, а также позволит разработать новые подходы к таргетной персонализированной терапии социально-значимых патологий. Активное развитие заболеваний легких, таких как астма, хроническая обструктивная болезнь легких, пневмония, фиброз и рак, часто ассоциируются с активацией NF-κB. Это свидетельствует о важной роли данного транскрипционного фактора как потенциальной мишени для новых терапевтических подходов. Детальное изучение механизмов активации NF-κB и его взаимосвязи с другими сигнальными путями будет способствовать решению основной задачи трансляционной биомедицины – развитию инновационных методов лечения и профилактики заболеваний человека, в том числе и патологии дыхательной системы.

Ключевые слова: NF-κB, нейроиммуноэндокринология, дыхательная система, инфламэйджинг, заболевание легких

DOI: 10.31857/S0869813924040029, EDN: COMLDV

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних 50 лет традиционные представления о механизмах регуляции процессов жизнедеятельности претерпели революционные изменения. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что различные клетки, принадлежащие к интегральным регуляторным системам организма: нервной, иммунной и эндокринной – синтезируют идентичные сигнальные молекулы – пептидные гормоны, биогенные амины, производные полиненасыщенных жирных кислот, а также другие биологически активные вещества – медиаторы межклеточных взаимодействий [1, 2].

Все более актуальной проблемой современной биомедицины становится выяснение поликомпонентного и многоуровневого механизма единой нейроиммуноэндокринной регуляции физиологических функций, которой принадлежит роль универсального дирижера всех процессов жизнедеятельности [3, 4].

Таким образом, современные представления о механизмах жизнедеятельности не могут формироваться без учета важного вклада нейроиммуноэндокринных молекулярных взаимосвязей, формирующихся практически в каждом органе и системе живого организма и играющих ключевую роль в обеспечении их функций как в условиях физиологической нормы, так и при различной патологии. Дыхательная система не является этому исключением.

Болезни органов дыхания лидируют в структуре общей заболеваемости населения и остаются одной из самых актуальных проблем современного здравоохранения. Различные факторы риска могут послужить развитию таких патологий, как пневмония, рак легких, астма, хроническая обструктивная болезнь легких и другие.

В связи с этим верификация и изучение сигнальных молекул как факторов, участвующих в нейроиммуноэндокринной регуляции функции легких в норме и патологии, которые, с одной стороны, могут рассматриваться как биомаркеры прогноза заболеваний, а с другой, как потенциальные мишени для таргетной эффективной терапии, является актуальной задачей современной трансляционной биомедицины [2].

Воспаление представляет собой как компенсаторно-приспособительную реакцию, так и патологический процесс, развивающийся в тканях при нарушении структуры и функций различных органов. Изучению сигнальных молекулярных механизмов развития воспаления посвящено большое количество исследований. В последние годы пристальное внимание исследователей привлекает семейство транскрипционных факторов NF-κB.

Транскрипционный фактор NF-κB (ядерный фактор «каппа-би»; англ. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB) представляет собой универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов, модулирующих иммунный ответ, а также клеточное обновление (баланс между пролиферацией и апоптозом клеток). Нарушение регуляции NF-κB приводит к развитию воспаления, аутоиммунным заболеваниям, а также способствует течению вирусных инфекций и прогрессии опухолей [5].

Имеются сведения о том, что фактор NF-κB играет важную роль в морфогенезе легких [6], способствуя созреванию альвеолярного эпителия и продукции сурфактанта.

Выяснению значения фактора NF-κB в механизмах развития патологии дыхательной системы посвящены отдельные экспериментальные и клинические исследования; аналитические обзоры, касающиеся роли этой сигнальной молекулы в аспекте нарушений функций дыхания, отсутствуют. Данная статья ставит своей целью восполнить этот пробел.

Семейство NF-κB: общая характеристика и структура

NF-κB был впервые обнаружен и охарактеризован 25 лет назад как ключевой индуцируемый регулятор экспрессии генов в иммунной системе [7]. Врожденные и адап-

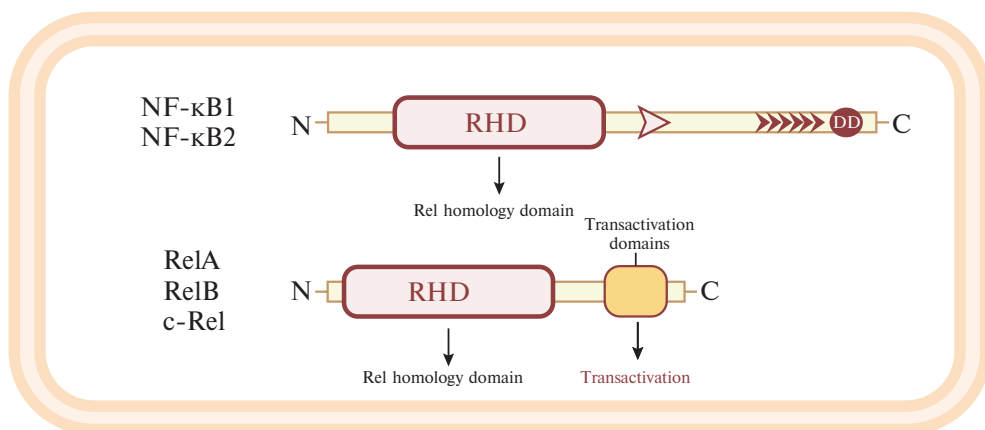


Рис. 1. Структура белков семейства NF-κB. TAD — домен активации транскрипции, RHD — домен гомологии Rel, DD — домен димеризации.

тивные иммунные реакции, развитие и поддержание пула клеток иммунной системы находятся под контролем семейства транскрипционных факторов NF-κB. Данное семейство состоит из 5 родственных транскрипционных факторов:

- NF-κB1 (p50);
- NF-κB2 (p52);
- RelA (p65);
- RelB;
- c-Rel.

Все белки семейства NF-κB содержат общий N-концевой домен, известный как домен гомологии Rel, димеризующий ДНК [8]. Посредством данного домена факторы NF-κB образуют гомо- и гетеродимеры. Именно в форме гомо- и гетеродимеров данные белки регулируют транскрипцию [7]. К формированию гомодимеров способны NF-κB1 и NF-κB2. Обнаружено, что гомодимеры негативно регулируют транскрипцию целевых генов. Так, при мутации серина 340 (эквивалента человеческого серина 343) в аланин у мышей с нокаутом NF-κB1 было продемонстрировано, что противовоспалительная активность NF-κB1 обусловлена присутствием гомодимеров. При повреждении канцерогеном диэтилнитрозамином, используемым для индуцирования гепатоцеллюлярной карциномы, у мышей с разрушением гомодимера NF-κB1:NF-κB1 наблюдалось усиленное острое воспаление по сравнению с мышами контрольной группы [9].

RelB, c-Rel и RelA содержат C-концевые домены активации транскрипции (TAD), которые обеспечивают рекрутирование коактиватора и экспрессию генов-мишеней. У NF-κB1 и NF-κB2 TAD отсутствуют [10], поэтому они активируют процесс транскрипции через RelB, c-Rel, RelA или другими TAD-содержащими белками, образуя с ними гетеродимеры (рис. 1).

В большинстве клеток комплексы NF-κB неактивны, находятся преимущественно в цитоплазме в комплексе с ингибиторными белками IκB (IκBα, IκBβ, IκBε, IκBζ, p100, p105, Bcl3, IκBns). Все белки этого семейства имеют анкириновые повторы — фрагменты из 33 аминокислотных остатков, состоящие из двух альфа-спиралей, разделенных петлями. Анкириновые повторы отвечают за регуляцию локализации NF-κB в клетке путем связывания с доменом гомологии Rel и распада комплекса в цитоплазме [11].

Активация сигнального пути NF-κB

Активация NF-κB включает два основных сигнальных пути – канонический и неканонический (или альтернативный), оба важны для регуляции иммунных и воспалительных реакций, несмотря на различия в их сигнальных механизмах.

Канонический путь активируется при воздействии на рецепторы клетки [12] воспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли α (TNFα), интерлейкин 1 (IL-1), эпидермальный фактор роста (EGF), или другими возможными воспалительными сигналами, например, бактериальными липополисахаридами (BLPS). Данные стимулы активируют комплекс IκB-киназы (IKK), состоящий из двух каталитически активных киназ – IKKα (IKK1), IKKβ (IKK2) и NF-κB-модификатора (NEMO) [13]. Это приводит к фосфорилированию ингибиторной субъединицы NF-κB/IκB [14], ее дальнейшему полиубиквитинированию и деградации 26S протеасомой. Однако есть доказательства того, что протеасома 20S конститутивно перерабатывает p105 (белок-предшественник) в NF-κB1 независимым от убиквитина образом в условиях *in vivo* [15]. Этот процесс позволяет активным субъединицам NF-κB (предположительно, гетеродимерам RelA:NF-κB1 и c-Rel:NF-κB1) локализоваться в ядре и регулировать транскрипцию генов (рис. 2) [16].

Канонический путь NF-κB быстро активируется как во врожденных, так и в адаптивных иммунных клетках многочисленными сигналами через врожденные PRR (рецепторы опознавания паттерна), TCR (Т-клеточный рецептор), BCR (В-клеточный рецептор), рецепторы провоспалительных цитокинов и т. д. [17–20].

Активация неканонического пути NF-κB вовлекает различные сигнальные молекулы и приводит к преимущественной активации димера NF-κB2/RelB. Этот путь основан на процессинге белка-предшественника NF-κB2 – p100. Активация киназы NIK (митоген-активируемая белковая киназа 3) приводит к фосфорилированию IKKα киназой p100/NF-κB, которая после фосфорилирования p100 подвергается убиквитинированию и протеасомной деградации [21].

В отличие от конститутивного и котрансляционного процессинга p105, процессинг p100 является сигнально-индуцированным и посттрансляционным событием [22]. Поскольку p100 предпочтительно взаимодействует с RelB, процессинг p100 не только образует p52, но также вызывает транслокацию NF-κB2/RelB в ядро [21]. Этот транслоцированный комплекс затем связывается с ДНК и индуцирует экспрессию генов-мишеней, таких как воспалительные цитокины и модуляторы пути NF-κB.

В отличие от активации канонического NF-κB различными рецепторными сигналами, только определенные члены суперсемейства TNFR опосредуют индукцию неканонической передачи сигналов NF-κB (рис. 3). К ним относятся LTβR [23], CD40 [24], BAFFR [25], RANK [26] и другие. Отличительной чертой неканонической активации NF-κB является медленная кинетика и зависимость синтеза белка *de novo*.

Канонический путь NF-κB является предпосылкой для механизма воспаления и решающим фактором модуляции врожденного иммунитета, тогда как неканонический путь NF-κB необходим для развития лимфоидных органов, а также адаптивного иммунитета [25].

Функции транскрипционного фактора NF-κB

Основной функцией семейства белков NF-κB является регуляция определенных иммунных и воспалительных реакций [10, 27, 28]. Так, последовательностями, связывающими NF-κB, являются гены провоспалительных цитокинов, таких как TNF, IL-6, IL-1β, молекул клеточной адгезии – ICAM, VCAM, ферментов – ЦОГ-2, 5-липоксигеназы [29]. В дополнение к индукции различных провоспалительных генов в клетках врожденного иммунитета NF-κB регулирует активацию, дифференцировку и эффекторную функцию воспалительных Т- и В-клеток [30]. Также было показано влияние

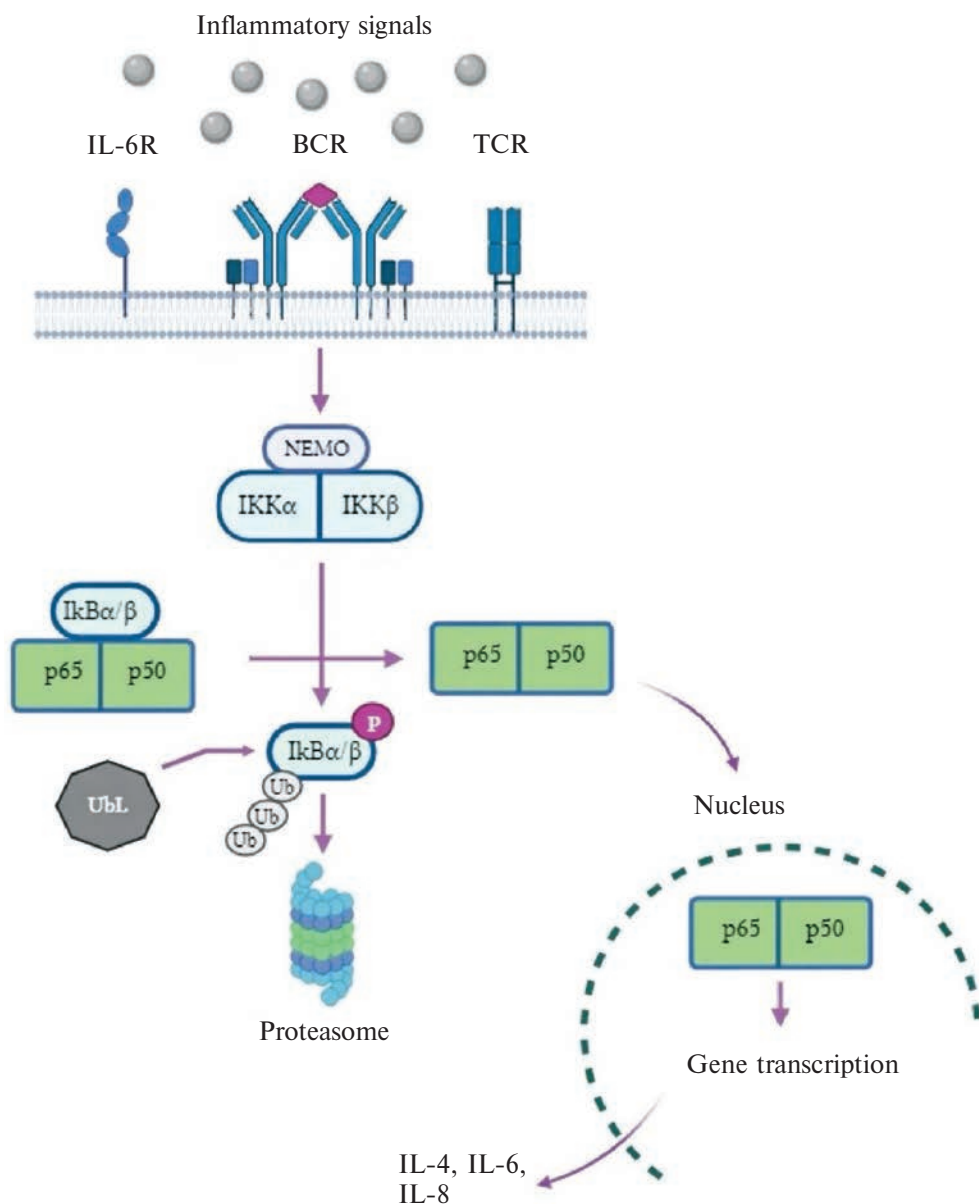


Рис. 2. Канонический NEMO-зависимый NF-κB сигнальный путь. Активация сигнального пути происходит через связывание различными рецепторами клеток своих лигандов. Далее происходит фосфорилирование IKK-комплекса, включающего NEMO, IKKα и IKKβ. Этот комплекс также фосфорилирует IκBα/β, что ведет к полиубикитинированию IκBα/β и деградации протеасомой. После этого комплекс p65/p50 транслируется в ядро и активирует экспрессию воспалительных генов (IL-4, IL-6, IL-8 и т.д.). BCR – В-клеточный рецептор, TCR – Т-клеточный рецептор, IL6R – рецептор IL-6, NEMO – NF-κB-модификатор, UbL – убиквитин-подобный белок, Ub – убиквитин, P – остаток фосфорной кислоты.

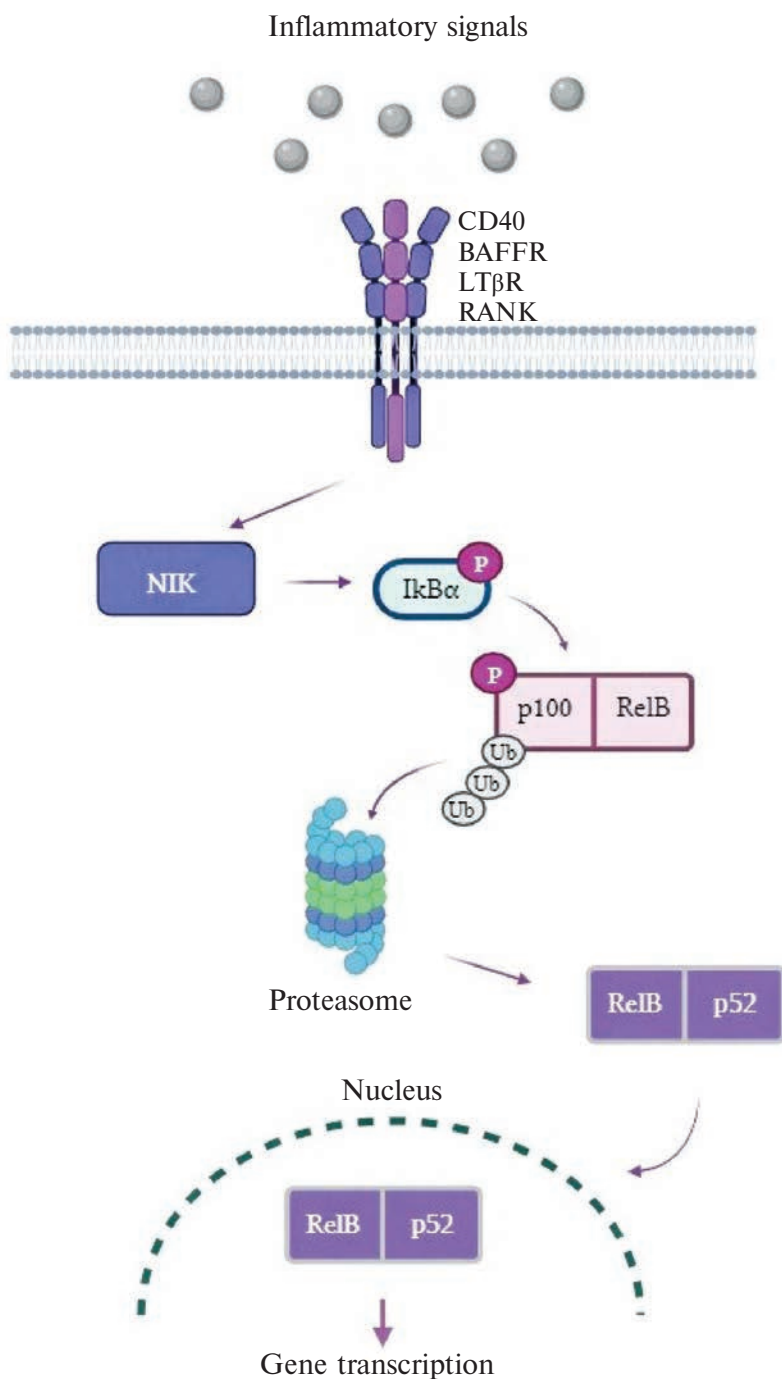


Рис. 3. Неканонический NEMO-независимый NF-κB сигнальный путь. Неканонический путь NF-κB индуцируется через рецепторы семейства TNF (CD40, BAFFR, LTβR и RANK). Далее происходит активация NIK, которая фосфорилирует комплекс p100/RelB, что приводит к убиквитинилированию p100 и его дальнейшей протеасомной деградации, а также образованию комплекса RelB/p52 и его транслокации в ядро.

транскрипционного фактора на формирование вторичных лимфоидных органов, выработку антител и онкогенных хемокинов [31].

Последние исследования свидетельствуют о том, что NF-κB также играет роль в патогенезе воспалительных заболеваний. Нерегулируемая активация NF-κB является отличительной чертой хронического воспаления как патологического процесса. Таким образом, детальное выяснение механизма, лежащего в основе активации и провоспалительной функции NF-κB, имеет важное значение для разработки таргетных фармпрепаратов и повышения тем самым эффективности лечения воспалительных заболеваний.

Инфламэйджинг как патология нейроиммуноэндокринной регуляции: роль NF-κB

Старение клеток – это эволюционно детерминированный процесс, который можно представить как результат длительного влияния различных эндогенных и экзогенных стрессоров, включая воздействие генотоксических агентов, недостаток питательных веществ, гипоксию, митохондриальную дисфункцию, активацию онкогенов и других факторов [32]. При старении в клетках извращается синтез и секреция множества сигнальных молекул, участвующих в локальной нейроиммуноэндокринной регуляции межклеточных взаимодействий, включая провоспалительные цитокины и хемокины, модуляторы роста, ангиогенные факторы, матриксные металлопротеиназы (ММП) и др. В клетках формируется секреторный фенотип, связанный со старением (SASP) [33].

Такие клетки жизнеспособны *in vitro*, в отличие от апоптотических клеток, которые подвергаются запрограммированной клеточной гибели. Некоторые SASP факторы играют важную роль в возникновении устойчивой остановки клеточного цикла в стареющих клетках и, предположительно, способствуют опухолевой супрессии при клеточном старении. Тем не менее многие SASP факторы могут вызвать хроническое воспаление и/или онкогенез, в зависимости от биологического контекста.

В 2014 г. Franceschi был предложен новый термин «инфламэйджинг» (“inflammaging”), который характеризует хроническое слабовыраженное воспалительное состояние, развивающееся при клеточном старении, протекающее бессимптомно и являющееся деструктивным для организма [34]. По основным признакам инфламэйджинг значительно отличается от острого воспаления.

Молекулы, формирующие SASP, опосредованно задействованы в таких процессах, как ремоделирование, регенерация, метаболизм и онкогенез. Этот секреторный фенотип может оказывать положительные эффекты, например, активизирует иммунную систему при предраке [35] и способствует регенерационным процессам [36]. Однако SASP также ответственен за возникновение хронического воспаления и способствует развитию заболеваний, ассоциированных с возрастом, например, таких как аутоиммунные заболевания, сахарный диабет 2-го типа, ожирение, атеросклероз и опухолевый рост. Существует прямая связь возрастного истощения иммунной системы с накоплением стареющих клеток: при нокауте основного медиатора цитотоксичности иммунных клеток – перфорина у мышей наблюдалось накопление стареющих клеток и продукция таких провоспалительных факторов, как RANTES, TNF-α, IP-10 и MIG через сигнальный путь NF-κB, что приводило к возникновению хронического воспаления [37, 38].

Сигнальная роль фактора транскрипции NF-κB имеет важное значение в процессах старения, а его разнообразные функции связаны с основными признаками данного процесса, такими как изменение межклеточной коммуникации, повреждение ДНК, возникновение окислительного стресса, воспаление, изменение микробиоты, дисфункция митохондрий [39–43].

Исследования на мышах с нокаутом NF-κB1 (неспособных к подавлению экспрессии провоспалительных генов) показали, что возникновение хронического воспаления

приводит к дисфункции мезенхимальных стволовых клеток и клеток-предшественников, при этом нокаут NF- κ B1 вызывает формирование у молодых животных фенотипа, характерного для животных среднего возраста, основными проявлениями которого являются нарушение процесса остеогенеза и увеличение жировой массы [44].

При ингибировании p65, белка из семейства NF- κ B, было подтверждено, что процесс старения, вызываемый в мезенхимальных стволовых клетках (МСК) как повреждением ДНК, так и различными препаратами, например, палбоциклибом, регулируется сигнальным путем p65. Терапия ингибиторами p65 – куркумином, JSH-23 (селективный ингибитор ядерной транслокации p65), MG-132 (блокатор активации p65) предотвращает остановку клеточного цикла. Кроме того, ингибирование p65 приводит к инактивации провоспалительных молекул как компонентов SASP [45]. Это свидетельствует о том, что существует возможность использования ингибиторов p65 как блокаторов передачи SASP между клетками, тем самым уменьшая накопления стареющих клеток в организме.

Нервные клетки, включая астроциты, микроглию, нейрональные клетки, также способны к экспрессии цитокинов [46] и Toll-подобных рецепторов (TLR). TLR в основном активируют канонический сигнальный путь NF- κ B, что приводит к экспрессии провоспалительных факторов [47]. При анализе уровня провоспалительных цитокинов в спинномозговой жидкости у пожилых людей было выяснено, что уровни TNF- α , IP-10 и IL-8 повышаются с возрастом. У пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдается повышенное содержание уровня IL-8. IL-8 является основным провоспалительным хемокином, который образуется макрофагами и вызывает миграцию различных иммунных клеток в зону воспаления. Исследование уровня противовоспалительного цитокина IL-10 показало, что снижение содержания данной молекулы в спинномозговой жидкости наблюдалось в группе людей среднего возраста (40–59 лет). У пациентов с рассеянным склерозом снижение содержания IL-10 и последующее за ним повышение уровня провоспалительных молекул наблюдается в более раннем возрасте [48]. Это свидетельствует о том, что некоторые возраст-ассоциированные неврологические расстройства связаны именно с развитием инфламэйджинга.

Инфламэйджинг и опухолевый рост

В основе возникновения нейроэндокринных очагов метаплазии в эпителиальных опухолях (карциномах) лежит процесс нейроэндокринной трансдифференцировки, который представляет собой приобретение характеристик нервных и эндокринных клеток эпителиальными опухолевыми клетками. Такие опухоли способны к экспрессии специфичных сигнальных молекул/биомаркеров – хромогранина А и секретогранинов [49].

Представляется немаловажным участие NF- κ B-зависимых факторов SASP в формировании нейроэндокринных очагов метаплазии в опухолях в различных висцеральных органах – они могут оказывать паракринный эффект на клетки эпителия и способствовать трансдифференцировке эпителиоцитов. При ингибировании сигнального пути NF- κ B с помощью репрессора I κ B α , удерживающего гетеродимер p50/p65 от релокализации в ядро и активации, было показано, что данные NF- κ B-независимые SASP клетки проявляли низкую способность к образованию нейроподобных структур и выработку специфичных маркеров [50]. Опухоли, возникшие в результате нейроэндокринной трансдифференцировки не такие злокачественные, как классические карциномы.

В настоящее время сформирована концепция, согласно которой Ca²⁺-сигналинг является важным регулятором процесса старения [51]. Обнаружено, что провоспалительный NF- κ B-зависимый секрет под индукцией передачи сигналов посредством Ca²⁺ способствует нейроэндокринной трансдифференцировке эпителиальных клеток рака молочной железы. Было выяснено, что как и в клетках с SASP, так и в эпителиаль-

ных клетках опухоли, прошедших трансдифференцировку, наблюдается увеличение уровня содержания Ca^{2+} [52]. Преждевременное старение клеток, вызванное химиотерапией, также характеризуется наличием у клеток фенотипа SASP [53].

NF-κB: участие в нейроиммуноэндокринных механизмах заболеваний дыхательной системы

Бронхиальная астма. Бронхиальная астма — хроническое заболевание легких, которое до недавнего времени было классифицировано на две основные формы: аллергическая астма (которая начинается в детском возрасте и связана с иммунным ответом клеток Т-хелперов 2) и неаллергическая астма (начинающаяся уже во взрослом возрасте, в основном у женщин и людей с ожирением) [54]. Многочисленные исследования выявили снижение тяжести течения астмы и ее обострений после снижения массы тела [55, 56].

Морфологическим субстратом астмы является воспалительный процесс, вызываемый инфильтрацией в легкие разнообразных клеточных элементов, таких как эозинофилы, тучные клетки, Т-лимфоциты и макрофаги. В то же время наблюдается усиление экспрессии провоспалительных белков, включая повышение содержания в эпителии дыхательных путей цитокинов, таких как интерлейкин-1β (IL-1β), интерлейкин-4 (IL-4) и интерлейкин-5 (IL-5), γ-интерферон, фактор некроза опухоли (TNF-α); хемокинов — интерлейкин-8 (IL-8), эотаксин, моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1), хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-клетками при активации (RANTES); ферментов — циклооксигеназа-2 (COX-2) и индуцибельная NO-синтаза (iNOS); молекул адгезии — E-селектин, ICAM, VCAM-1 [57, 58]. Гены этих белков находятся под контролем NF-κB, а их экспрессия свидетельствует о важной роли NF-κB в поддержании хронического воспаления при астме [59].

Выделение лимфоцитов периферической крови и дальнейший иммуноцитохимический анализ NF-κB у пациентов с обострением бронхиальной астмы показал повышение уровня экспрессии транскрипционного фактора, коррелирующее с изменением в соотношении уровней экспрессии белков апоптоза: в клетках наблюдается значительное увеличение синтеза антиапоптотического белка BCL-2 и уменьшение проапоптотического BAX [60].

Снижение апоптоза иммунных клеток, вызванное изменением экспрессии NF-κB, приводит к их дальнейшей инфильтрации в легкие. При изучении содержания ядерно-транскрипционного фактора NF-κB в сыворотке крови детей, больных бронхиальной астмой, с помощью иммуноферментативного метода выявлено повышение содержания NF-κB в 1.95 раза по сравнению с группой здоровых детей [61]. Исследования на трансгенных мышах показывали, что селективная активация NF-κB в эпителии дыхательных путей достаточна для того, чтобы вызвать гиперреактивность дыхательных путей и утолщение гладких мышц, которые являются критическими признаками аллергического заболевания дыхательных путей, а ингибирование NF-κB в эпителии дыхательных путей уменьшает воспаление [62]. При изучении белка RUNX1 (регулятора сигнального пути воспаления NF-κB при легочных заболеваниях) выявлено, что его повышенная экспрессия в образцах легких человека связана с гиперреактивностью дыхательных путей и возникновением астмы у детей [63].

Для терапии данного заболевания активно используются глюкокортикоиды, ингибирующие NF-κB путем его связывания с рецептором глюкокортикоидов, предотвращая взаимодействие NF-κB и ДНК. Биопсия бронхов у пациентов с астмой показывает, что применение будесонида (лекарственное средство, глюкокортикоид) снижает связывание NF-κB и ДНК [64].

Рак легкого. Рак легкого — один из видов опухолевой трансформации бронхиального эпителия, одна из самых частых форм злокачественных опухолей, диагностируемых в течение последних десятилетий во всем мире. В соответствии с гистологической картиной опухоли основными типами рака легкого являются следующие: мелкокле-

точный рак легкого (тип опухоли с агрессивным и стремительным течением), немелкоклеточный (аденокарциномы и плоскоклеточные карциномы с медленным течением).

Активация NF-κB связана с развитием и прогрессированием множества видов рака человека и является молекулярным связующим звеном между процессами воспаления и развитием опухолей [65]. Воспалительный транскрипционный фактор NF-κB регулирует развитие злокачественной опухоли посредством широкого спектра физиологических и патологических процессов, включая клеточное старение, апоптоз, изменение метаболизма, реакции на стресс и т. п.

Иммуногистохимическое исследование образцов рака легкого показало высокий уровень экспрессии активированного ядерного NF-κB, причем экспрессия найдена во всех типах рака легкого. При мелкоклеточном раке легкого наблюдался самый высокий уровень экспрессии, а при немелкоклеточном раке легкого уровень экспрессии ядерного NF-κB выше в аденокарциноме по сравнению с плоскоклеточной карциномой [66].

При изучении клеточных линий немелкоклеточной карциномы было продемонстрировано, что компоненты табака стимулируют NF-κB-зависимую выживаемость опухолевых клеток [67].

С помощью протеасомного анализа бронхоальвеолярного лаважа проводилось исследование содержания белков, специфически продуцирующихся в дыхательных путях при раке легкого и хронической обструктивной болезни легких. Показано, что рак легких и хроническая обструктивная болезнь легких имеют некоторые общие патогенетические пути, такие как воспаление, реакция клетки на окислительный стресс, а также гликолиз и глюконеогенез. Ключевая сетевая сигнализация этих процессов осуществляется через транскрипционный фактор NF-κB [68].

Одним из факторов риска развития рака легких является курение. Миристоилированный богатый аланином субстрат С-киназы (MARCKS) – молекула, играющая важную роль в секреции муцина в дыхательных путях. MARCKS является диагностическим маркером множества заболеваний легких, включая немелкоклеточный рак легкого, и зарекомендовал себя как терапевтическая мишень для борьбы с данным видом рака [69]. Сигаретный дым может активировать MARCKS — высокие уровни фосфорилированного MARCKS были обнаружены в тканях пациентов с раком легких и были связаны со статусом курения. Было показано, что MARCKS связан с активацией NF-κB и модулирует ее – так, совместная экспрессия фосфорилированной формы MARCKS и p65 была показана в результате иммуногистохимического исследования образцов рака легких, связанных с курением. К тому же высокие уровни экспрессии двух этих молекул у пациентов чаще коррелировали с летальным исходом, чем у пациентов с высокой экспрессией одного из белков или низкой экспрессией обоих [70]. Тем не менее нецелесообразно использовать NF-κB как терапевтическую мишень при раке легкого, так как данный транскрипционный фактор обладает огромным количеством регуляторных функций, но есть возможность бороться с его гиперактивацией путем ингибирования фосфорилирования MARCKS для прекращения прогрессирования рака легких, связанного с курением.

COVID-19. Коронавирус COVID-19 вызвал увеличение заболеваемости и смертности людей по всему миру. Несмотря на разработку и использование вакцин, появление новых штаммов SARS-CoV-2, а также медленный темп вакцинации вынуждает научное сообщество на изучение воздействия вируса на организм и поиск новых подходов к лечению заболевания. Клиническая картина COVID-19 широко варьируется от бессимптомной формы до легкой или атипичной пневмонии и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [71].

При заражении организма SARS-CoV-2 ранняя клеточная реакция заключается в ингибировании репликации вируса [72]. Она координируется цитокинами – семейством интерферонов 1-го типа (IFN1) [73]. Активация цитокинов нуждается в синтезе регуляторных белков интерферона и некоторых белков семейства NF-κB (p65 и p50).

Сигнальный путь NF-κB при этом активируется как каноническим, так и неканоническим путем, индуцируя выработку провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также развитие глобальных воспалительных процессов в организме, в том числе возникновение пневмонии.

Кроме того, индуцируется несколько генов, находящихся под контролем NF-κB, и все эти события создают условия для успешной репликации вируса. Так, при сайленсинге p65 и снижении экспрессии данного белка происходило значительное снижение уровня вирусного нуклеокапсидного белка, а сайленсинг p50 приводил к его полному исчезновению. За счет действия различных ингибиторов на активацию каскада NF-κB до заражения SARS-CoV-2, при дальнейшем инфицировании наблюдалось умеренное или значительное уменьшение инфицированных клеток без цитотоксических эффектов или с минимальными цитотоксическими эффектами при низких концентрациях ингибитора [74].

Обострение воспалительных иммунных реакций является частым и опасным для жизни клиническим проявлением, наблюдаемым у пациентов с интенсивной терапией [74–76]. В сыворотке крови тяжелых и критических пациентов с COVID-19 значительно повышено содержание провоспалительных цитокинов и хемокинов IL-1β, TNF-α, IL-6 и IP-10, находящихся под контролем транскрипционного фактора NF-κB [77, 78].

Вирусный белок ORF3a SARS-CoV-2 выступает как положительный регулятор передачи сигналов NF-κB за счет взаимодействия с IKKβ и NEMO [79]. Также было выявлено, что белок ORF3a индуцирует апоптоз в клетках [80].

Очевидно, что одним из основных факторов тяжести заболевания и риска смертности от COVID-19 является возраст [81]. Изучение течения болезни у мышей, зараженных адаптированным SARS-CoV-2, показало, что у молодых особей наблюдалось небольшое нарушение функции легких, и выздоровление происходило быстрее. В то же время у старых мышей наблюдалась более выраженная потеря легочной функции, повреждение эпителия, перибронхиолярное лимфоцитарное воспаление, кровотечение и отек легких, а также у этих животных был обнаружен антиген к вирусу в эпителии дыхательных путей [82].

К тому же наблюдалось повышенное содержание провоспалительных цитокинов, находящихся под контролем транскрипционного фактора NF-κB. Так, повышение уровня IL-6 как одно из последствий COVID-19 приводит к активации молекулярных каскадов NF-κB. Введение в организм тоцилизумаба, антитела против рецептора данного провоспалительного цитокина, было связано со снижением риска инвазивной искусственной вентиляции легких или смерти пациентов [83].

Острый респираторный дистресс-синдром. Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) – тяжелое осложнение респираторных заболеваний, характеризующееся двухсторонним воспалением легких с инфильтратами и отеком. Увеличение капиллярной проницаемости для нейтрофилов, аккумуляция их в легких и повреждение капиллярно-альвеолярного барьера считается причиной развития воспаления легочной ткани и возникновения ОРДС.

NF-κB играет важную роль в приобретении эндотелиальными клетками проадгезивного фенотипа, способствующего трансмиграции нейтрофилов в очаг воспаления. Наличие инфекционных агентов в респираторной системе активирует эндотелиальные клетки путем воздействия выделяемых макрофагами цитокинов – IL-1β, TNF и хемокинов – IL-8, MIP-2α [84]. Активация эндотелия приводит к возникновению воспаления и дополнительной стимуляции макрофагов. В результате наблюдается усиленная экспрессия адгезивных молекул клетками эндотелия – Р-селектина, Е-селектина, ICAM-1, которые связываются с рецепторами на нейтрофилах и транслоцируют их в очаг воспаления. Также клетки эндотелия трансформируются в протромботическую поверхность, вызывая образование тромбина и внутрисосудистую коагуляцию. Все перечисленные сигнальные молекулы, участвующие в процессах развития ОРДС, находятся под конт-

ролем NF-κB [85, 86]. Так, при блокаде эндотелиального NF-κB у мышей дикого типа наблюдалось восстановление количества плазменных маркеров свертываемости крови и уменьшение отложения фибрина в тканях [86].

Внеклеточная никотинамидфосфорибозилтрансфераза (eNAMPT) была идентифицирована как молекулярная структура, связанная с повреждением (DAMP). eNAMPT лигирует толл-подобный рецептор 4 (TLR4), регулирующий активацию воспалительного каскада через канонический путь NF-κB. Экспрессию eNAMPT индуцируют факторы, приводящие к возникновению ОРДС – гипоксия, различные травмы и инфекции [87]. Уровни eNAMPT в плазме тесно связаны с тяжестью и смертностью при ОРДС, вызванном сепсисом и травмой [88, 89].

В тканях легких модельных животных с ОРДС, вызванным применением аппарата ИВЛ, обнаружено увеличенное содержание активированного NF-κB. Нарушение регуляции сигнального пути NFκB и генерация АФК были заметно снижены при введении внутривенно eNAMPT-нейтрализующего моноклонального антитела, что подчеркивает ключевое участие eNAMPT в активации канонического пути NF-κB и последующем системном воспалении [90].

При ОРДС, вызванном метициллин-резистентным *S. aureus*, сигнальный путь NF-κB является способствующим фактором развития патологического процесса. Транскрипционный фактор FOXN3 регулирует активацию NF-κB в ядре. p38 способен к фосфорилированию FOXN3 по участкам S83 и S85, приводя к деградации IκBα и активации сигнального пути NF-κB. Экспрессия FOXN3 снижается в легких экспериментальных животных при введении им интратрахеально *S. aureus* для развития у них ОРДС. У модельных мышей с двойной мутацией S83 и S85 и невозможностью фосфорилирования наблюдалось уменьшение притока нейтрофилов и альвеолярного отека. Исследование клинических образцов легочной ткани пациентов с туберкулезом легких или грибковой пневмонией вместе с прилегающими здоровыми тканями показало, что экспрессия FOXN3 снижена в области воспаления [91]. Так, нацеливание на FOXN3 для снижения активации NF-κB-сигнального пути и может служить эффективной терапевтической стратегией для лечения воспалительных заболеваний легких, в том числе ОРДС.

Хроническая обструктивная болезнь легких. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – одно из самых распространенных заболеваний легких, характеризующееся затрудненным дыханием, хроническим кашлем и ограничением поступления потока воздуха в дыхательные пути. Данная болезнь не поддается лечению и имеет периоды обострения.

Центральным механизмом возникновения ХОБЛ является хроническое воспаление [92]. Индукторами воспаления в большинстве случаев являются сигаретный дым, инфекционные агенты и загрязненный воздух [93]. Данные вещества способны к связыванию с TLR и активации, инициируют MyD88-зависимые каскады, которые приводят к активации NF-κB с последующим синтезом цитокинов и хемокинов [94]. Эти сигнальные молекулы приводят к миграции моноцитов и нейтрофилов в легкие и дальнейшему выделению этими клетками MMP-9, MMP-2 и ELA-2. Эти протеолитические ферменты способствуют разрушению легочной ткани и процессах ремоделирования дыхательных путей [95]. Также было показано, что сигаретный дым и компоненты загрязненного воздуха способны увеличивать экспрессию и активацию TLR2 и TLR4 на альвеолярных макрофагах, усиливая воспаление [94]. Твердые частицы, содержащиеся в загрязненном воздухе, ингибируют мишень рапамицина млекопитающих (mTOR) [96]. mTOR регулирует выживаемость и клеточный рост, ингибирование передачи сигналов через эту молекулу привело к активации аутофагии в клетках эпителия дыхательных путей, гиперпродукции слизи и развитию воспаления [97]. Сигнальный путь NF-κB может позитивно или негативно регулироваться mTOR-аутофагией, так, например, ингибирование mTOR приводит к повышенной экспрессии провоспалительного IL-8, индуцированной активацией NF-κB [96].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

NF-κB играет важную роль в регуляции дыхательной функции в норме и патологии, а также в развитии воспалительных процессов в легких, которые могут возникнуть при неконтролируемой и длительной активации NF-κB.

Исследование роли одного из ключевых участников нейроиммуноэндокринной регуляции гомеостаза – транскрипционного фактора NF-κB – в патогенезе заболеваний легких является крайне важным и перспективным для понимания молекулярных механизмов возникновения и течения заболеваний, а также позволит разработать новые подходы к таргетной персонифицированной терапии социально-значимых заболеваний – бронхиальной астмы, рака легких, острого респираторного дистресс-синдрома и COVID-19.

Активное развитие заболеваний легких, таких как астма, ХОБЛ, пневмония, фиброз и рак, часто ассоциируется с активацией NF-κB. Это свидетельствует о важной роли данного транскрипционного фактора как потенциальной мишени для новых терапевтических подходов.

Детальное изучение механизмов активации NF-κB и его взаимосвязи с другими сигнальными путями будет способствовать решению основной задачи трансляционной биомедицины – развитию инновационных методов лечения и профилактики заболеваний человека, в том числе и патологии дыхательной системы.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (К. И. М., Я. П. К.), сбор литературных данных (Б. Ю. И., М. Е. С.), анализ литературных данных (М. Е. С., З. Т. С.), написание и редактирование манускрипта (Б. Ю. И., М. Е. С., К. И. М.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии Минздрава РФ. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pearse AGE* (1979) The diffuse endocrine system and the implications of the APUD concept. *Int Surg* 64(2): 5–7.
2. *Пальцев МА, Кветной ИМ, Полякова ВО, Линькова НС, Костылев АС* (2012) Сигнальные молекулы: место и роль в персонифицированной диагностике, лечении и профилактике социально значимых заболеваний. *Мол мед* 5: 3–8. [*Paltsev MA, Kvetnoy IM, Polyakova VO, Linkova NS, Kostylev AS* (2012) Signaling molecules: their place and role in the personalized diagnosis, treatment and prevention of socially significant diseases. *Mol Med* 5: 3–8. (In Russ)].
3. *Blalock JE, Smith EM* (1985) The immune system: our mobile brain? *Immunol Today* 6(4): 115–117.
[https://doi.org/10.1016/0167-5699\(85\)90070-2](https://doi.org/10.1016/0167-5699(85)90070-2)
4. *Пальцев МА, Кветной ИМ* (2014) Руководство по нейроиммуноэндокринологии. 3-е изд. М. Шико. [*Paltsev MA, Kvetnoy IM* (2014) A guide to neuroimmunoendocrinology. 3-e izd. M. Shiko. (In Russ)].

5. *Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71(3): 209–249.
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>
6. *Londhe VA, Nguyen HT, Jeng JM, Li X, Li C, Tiozzo C, Zhu N, Minoo P* (2008) NF- κ B induces lung maturation during mouse lung morphogenesis. *Dev Dyn* 237(2): 328–338.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21413>
7. *Davis R, Brown K, Siebenlist U, Staudt L* (2001) Constitutive nuclear factor kappa B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194(12): 1861–1874.
<https://doi.org/10.1084/jem.194.12.1861>
8. *Williams LM, Gilmore TD* (2020) Looking Down on NF- κ B. *Mol Cell Biol* 40(15): 104–120.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00104-20>
9. *Wilson C, Jurk D, Fullard N, Banks P, Page A, Luli S, Elsharkawy A, Gieling R, Chakraborty J, Fox C, Richardson C, Callaghan K, Blair G, Fox N, Lagnado A, Passos J, Moore A, Smith G, Tiniakos D, Mann J, Oakley F, Mann D* (2015) NF κ B1 is a suppressor of neutrophil-driven hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 6: 6818.
<https://doi.org/10.1038/ncomms7818>
10. *Mitchell J, Carmody R* (2018) NF- κ B and the Transcriptional Control of Inflammation. *Int Rev Cell Mol Biol* 335: 41–84.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.007>
11. *Gilmore TD* (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25(51): 6680–6684.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209954>
12. *Zhang L, Wei X, Wang Z, Liu P, Hou Y, Xu Y, Su H, Koci MD, Yin H, Zhang C* (2023) NF- κ B activation enhances STING signaling by altering microtubule-mediated STING trafficking. *Cell Rep* 42(3): 112185.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112185>
13. *Goel S, Oliva R, Jeganathan S, Bader V, Krause LJ, Kriegler S, Stender ID, Christine CW, Nakamura K, Hoffmann JE, Winter R, Tatzelt J, Winklhofer KF* (2023) Linear ubiquitination induces NEMO phase separation to activate NF- κ B signaling. *Life Sci Allian* 6(4): e202201607.
<https://doi.org/10.26508/lsa.202201607>
14. *Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H* (2020) Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Therapy* 5(1): 209.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>
15. *Moorthy A, Savinova O, Ho J, Wang V, Vu D, Ghosh G* (2006) The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *EMBO J* 25(9): 1945–1956.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601081>
16. *Hayden M, Ghosh S* (2011) NF- κ B in immunobiology. *Cell Res* 21(2): 223–244.
<https://doi.org/10.1038/cr.2011.13>
17. *Chen L, Greene W* (2004) Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 392–401.
<https://doi.org/10.1038/nrml368>
18. *Vallabhapurapu S, Karin M* (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27: 693–733.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132641>
19. *Sun S* (2011) Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res* 21(1): 71–85.
<https://doi.org/10.1038/cr.2010.177>
20. *Tas SW, Bryant VL, Cook MC* (2023) Editorial: Non-canonical NF- κ B signaling in immune-mediated inflammatory diseases and malignancies. *Front Immunol* 14: 1252939.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1252939>
21. *Xiao G, Harhaj E, Sun S* (2001) NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7: 401–409.
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00187-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00187-3)
22. *Haga M, Okada M* (2022) Systems approaches to investigate the role of NF- κ B signaling in aging. *Biochem J* 479(2): 161–183.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20210547>
23. *Dejardin E, Droin N, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li Z, Karin M, Ware C, Green D* (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17(4): 525–535.
[https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00423-5)

24. Coope H, Atkinson P, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman M, Klaus G, Johnston L, Ley S (2002) CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. The EMBO J 21(20): 5375–5385.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdf542>
25. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U (2002) BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappaB2 in maturing B cells. Nat Immunol 3: 958–965.
<https://doi.org/10.1038/ni842>
26. Novack D, Yin L, Hagen-Stapleton A, Schreiber R, Goeddel D, Ross F, Teitelbaum S (2003) The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. J Exp Med 198(5): 771–781.
<https://doi.org/10.1084/jem.20030116>
27. Kok FO, Wang H, Riedlova P, Goodyear CS, Carmody RJ (2021) Defining the structure of the NF- κ B pathway in human immune cells using quantitative proteomic data. Cell Signal 88: 110154.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110154>
28. Serasanambati M, Chilakapati SR (2016) Function of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in human diseases – a review. South Ind J Biol Sci 2 (4): 368–387.
<https://doi.org/10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103443>
29. Ahn KS, Aggarwal BB (2005) Transcription Factor NFkB A Sensor for Smoke and Stress Signals. Ann N Y Acad Sci 1056: 218–233.
<https://doi.org/10.1196/annals.1352.026>
30. Paun A, Claudio E, Siebenlist UK (2021) Constitutive activation of NF- κ B during early bone marrow development results in loss of B cells at the pro-B-cell stage. Blood Advanc 5(3): 745–755.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002932>
31. Strickland I, Ghosh S (2006) Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation. Ann Rheumat Diseases 65(3): 75–82.
<https://doi.org/10.1136/ard.2006.058438>
32. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, Campisi J, Collado M, Evangelou K, Ferbeyre G, Gil J, Hara E, Krizhanovsky V, Jurk D, Maier AB, Narita M, Niedernhofer L, Passos JF, Robbins PD, Schmitt CA, Sedivy J, Voulas K, von Zglinicki T, Zhou D, Serrano M, Demaria M (2019) Cellular Senescence: Defining a Path Forward. Cell 179(4): 813–827.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
33. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell M, Ruiz A, Kalegari P, Ferbeyre G (2019) The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. Cytokine 117: 15–22.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.01.013>
34. Franceschi C, Campisi J (2014) Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. J Gerontol A Bio I Sci Med Sci 69 Suppl 1: 4–9.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>
35. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, Premrsirut P, Luo W, Chicas A, Lee CS, Kogan SC, Lowe SW (2011) Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. Genes Dev 25(20): 2125–2136.
<https://doi.org/10.1101/gad.17276711>
36. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijj J, Van Steeg H, Dollé ME, Hoeijmakers JH, de Bruin A, Hara E, Campisi J (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. Dev Cell 31(6): 722–733.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
37. Ovadya Y, Landsberger T, Leins H, Vadai E, Gal H, Biran A, Yosef R, Sagiv A, Agrawal A, Shapira A, Windheim J, Tsoory M, Schirmbeck R, Amit I, Geiger H, Krizhanovsky V (2018) Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. Nat Commun 9(1): 5435.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07825-3>
38. Eggert T, Wolter K, Ji J, Ma C, Yevsa T, Klotz S, Medina-Echeverez J, Longerich T, Forgues M, Reisinger F, Heikenwalder M, Wang XW, Zender L, Greten TF (2016) Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. Cancer Cell 30(4): 533–547.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.003>
39. Santoro A, Zhao J, Wu L, Carru C, Biagi E, Franceschi C (2020) Microbiomes other than the gut: inflammaging and age-related diseases. Semin Immunopathol 42(5): 589–605.
<https://doi.org/10.1007/s00281-020-00814-z>
40. Bosco N, Noti M (2021) The aging gut microbiome and its impact on host immunity. Genes Immun 22(5-6): 289–303.
<https://doi.org/10.1038/s41435-021-00126-8>
41. Chapman J, Fielder E, Passos JF (2019) Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. FEBS Lett 593(13): 1566–1579.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13498>

42. *Burtscher J, Burtscher M, Millet GP* (2021) The central role of mitochondrial fitness on anti-viral defenses: An advocacy for physical activity during the COVID-19 pandemic. *Redox Biol* 43: 101976.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101976>
43. *Cai Y, Song W, Li J, Jing Y, Liang C, Zhang L, Zhang X, Zhang W, Liu B, An Y, Li J, Tang B, Pei S, Wu X, Liu Y, Zhuang CL, Ying Y, Dou X, Chen Y, Xiao FH, Li D, Yang R, Zhao Y, Wang Y, Wang L, Li Y, Ma S, Wang S, Song X, Ren J, Zhang L, Wang J, Zhang W, Xie Z, Qu J, Wang J, Xiao Y, Tian Y, Wang G, Hu P, Ye J, Sun Y, Mao Z, Kong QP, Liu Q, Zou W, Tian XL, Xiao ZX, Liu Y, Liu JP, Song M, Han JJ, Liu GH* (2022) The landscape of aging. *Sci China Life Sci* 65(12): 2354–2454.
<https://doi.org/10.1007/s11427-022-2161-3>
44. *Josephson AM, Leclerc K, Remark LH, López EM, Leucht P* (2021) Systemic NF- κ B-mediated inflammation promotes an aging phenotype in skeletal stem/progenitor cells. *Aging* 13(10): 13421–13429.
<https://doi.org/10.18632/aging.203083>
45. *Mato-Basalo R, Morente-López M, Arntz OJ, van de Loo FAJ, Fafián-Labora J, Arufe MC* (2021) Therapeutic Potential for Regulation of the Nuclear Factor Kappa-B Transcription Factor p65 to Prevent Cellular Senescence and Activation of Pro-Inflammatory in Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 22(7): 3367.
<https://doi.org/10.3390/ijms22073367>
46. *Voet S, Prinz M, van Loo G* (2018) Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology. *Trends Mol Med* 25(2): 112–123.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.005>
47. *Chiarini A, Armato U, Hu P, Dal Prà I* (2020) Danger-Sensing/Patten Recognition Receptors and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 21(23): 9036.
<https://doi.org/10.3390/ijms21239036>
48. *Hu WT, Howell JC, Ozturk T, Gangishetti U, Kollhoff AL, Hatcher-Martin JM, Anderson AM, Tyor WR* (2019) CSF Cytokines in Aging, Multiple Sclerosis, and Dementia. *Front Immunol* 10: 480.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00480>
49. *Gallo M, Campione S, Di Vito V, Fortunati N, Lo Calzo F, Messina E, Ruggeri RM, Faggiano A, Colao AAL* (2021) Primary Neuroendocrine Neoplasms of the Breast: Still Open Issues. *Front Immunol* 11: 610230.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.610230>
50. *Raynard C, Ma X, Huna A, Tessier N, Massemín A, Zhu K, Flaman JM, Moulin F, Goehrig D, Medard JJ, Vindrieux D, Treilleux I, Hernandez-Vargas H, Ducreux S, Martin N, Bernard D* (2022) NF- κ B-dependent secretome of senescent cells can trigger neuroendocrine transdifferentiation of breast cancer cells. *Aging Cell* 21(7): e13632.
<https://doi.org/10.1111/acer.13632>
51. *Martin N, Bernard D* (2018) Calcium signaling and cellular senescence. *Cell Calcium* 70: 16–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.04.001>
52. *Huna A, Martin N, Bernard D* (2023) The senescence-associated secretory phenotype induces neuroendocrine transdifferentiation. *Aging* 15(8): 2819–2821.
<https://doi.org/10.18632/aging.204669>
53. *Pacifico F, Crescenzi E, Leonardi A* (2021) Analysis of the Contribution of NF- κ B in the Regulation of Chemotherapy-Induced Cell Senescence by Establishing a Tetracycline-Regulated Cell System. *Methods Mol Biol* 2366: 193–212.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1669-7_12
54. *Pakkasela J, Ilmarinen P, Honkamäki J, Tuomisto LE, Andersén H, Piirilä P, Hisinger-Mölkänen H, Sovijärvi A, Backman H, Lundbäck B, Rönmark E, Kankaanranta H, Lehtimäki L* (2020) Age-specific incidence of allergic and non-allergic asthma. *BMC Pulm Med* 20(1): 9.
<https://doi.org/10.1186/s12890-019-1040-2>
55. *Peters U, Dixon AE, Forno E* (2018) Obesity and asthma. *J Allerg Clin Immunol* 141(4): 1169–1179.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.004>
56. *Duncan EM, Elicker BM, Gierada DS, Nagle SK, Schiebler ML, Newell JD, Raymond WW, Lachowicz-Scroggins ME, Di Maio S, Hoffman EA, Castro M, Fain SB, Jarjour NN, Israel E, Levy BD, Erzurum SC, Wenzel SE, Meyers DA, Bleeker ER, Phillips BR, Mauger DT, Gordon ED, Woodruff PG, Peters MC, Fahy JV* (2018) National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI) Severe Asthma Research Program (SARP). Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. *J Clin Invest* 128(3): 997–1009.
<https://doi.org/10.1172/JCI95693>

57. *Lawrence T, Gilroy D, Colville P, Willoughby D* (2001) Possible new role for NF-κB in the resolution of inflammation. *Nat Med* 7: 1291–1297.
<https://doi.org/10.1038/nm1201-1291>
58. *Ghosh S, Karin M* (2002) Missing pieces in the NF-κB puzzle. *Cell* 109: S81–S96.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00703-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00703-1)
59. *Rico-Rosillo G, Vega-Robledo GB* (2011) The involvement of NF-κB Transcription factor in asthma. *Rev Alerg Mex* 58(2): 107–111.
60. *Abdulmir A, Kadhim H, Hafidh R, Ali M, Faik I, Abubaka F, Abbas K* (2009). Severity of asthma: the role of CD25+, CD30+, NF-kappaB, and apoptotic markers. *J Invest Allergol Clin Immunol* 19(3): 218–224.
61. *Dudnyk V, Kutsak O* (2018) NF-κB level in blood serum of children with bronchial asthma depending on the severity and level of disease control. *Sovrem Pediatr* 3(91): 8–11.
<https://doi.org/10.15574/SP.2018.91.8>
62. *Benjamin JT, Plosa EJ, Sucre JM, van der Meer R, Dave S, Gutor S, Nichols DS, Gulleman PM, Jetter CS, Han W, Xin M, Dinella PC, Catanzarite A, Kook S, Dolma K, Lal CV, Gaggar A, Blalock JE, Newcomb DC, Richmond BW, Kropski JA, Young LR, Guttentag SH, Blackwell TS* (2021) Neutrophilic inflammation during lung development disrupts elastin assembly and predisposes adult mice to COPD. *J Clin Invest* 131(1): 1–17.
<https://doi.org/10.1172/JCI139481>
63. *Haley KJ, Lasky-Su J, Manoli SE, Smith LA, Shahsafaee A, Weiss ST, Tantisira K* (2011) RUNX transcription factors: association with pediatric asthma and modulated by maternal smoking. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301(5): 693–701.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00348.2010>
64. *Wilson SJ, Wallin A, Della-Cioppa G, Sandström T, Holgate ST* (2001) Effects of budesonide and formoterol on NF-kappaB, adhesion molecules, and cytokines in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164(6): 1047–1052.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.6.2010045>
65. *Taniguchi K, Karin M* (2018) NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* 18(5): 309–324.
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>
66. *Tang X, Liu D, Shishodia S, Ozburn N, Behrens C, Lee J, Hong W, Aggarwal B, Wistuba II* (2006) Nuclear factor-κB (nf-κB) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. *Cancer* 107: 2637–2646.
<https://doi.org/10.1002/cncr.22315>
67. *Tsurutani J, Castillo SS, Brognard J, Granville CA, Zhang C, Gills JJ, Sayyah J, Dennis PA* (2005) Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFκappaB-dependent survival in lung cancer cells. *Carcinogenesis* 26(7): 1182–1195.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgi072>
68. *Pastor M, Nogal A, Molina-Pinelo S, Meléndez R, Salinas A, González De la Peña M, Martín-Juan J, Corral J, García-Carbonero R, Carnero A, Paz-Ares L* (2013) Identification of proteomic signatures associated with lung cancer and COPD. *J Proteom* 89: 227–237.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.037>
69. *Sheats MK, Yin Q, Fang S, Park J, Crews AL, Parikh I, Dickson B, Adler KB* (2019) MARCKS and Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 60(1): 16–27.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0285TR>
70. *Liu J, Chen SJ, Hsu SW, Zhang J, Li JM, Yang DC, Gu S, Pinkerton KE, Chen CH* (2021) MARCKS cooperates with NKAP to activate NF-κB signaling in smoke-related lung cancer. *Theranostics* 11(9): 4122–4136.
<https://doi.org/10.7150/thno.53558>
71. *Fara A, Mitrev Z, Rosalia RA, Assas BM* (2020) Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines. *Open Biol* 10(9): 200160.
<https://doi.org/10.1098/rsob.200160>
72. *TenOever BR* (2016) The Evolution of Antiviral Defense Systems. *Cell Host Microbe* 19(2): 142–149.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.006>
73. *Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS* (2019) Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity* 50: 907–923.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
74. *Nilsson-Payant BE, Uhl S, Grimont A, Doane AS, Cohen P, Patel RS, Higgins CA, Acklin JA, Bram Y, Chandar V, Blanco-Melo D, Panis M, Lim JK, Elemento O, Schwartz RE, Rosenberg BR, Chandwani R, tenOever BR* (2021) The NF-κB Transcriptional Footprint Is Essential for SARS-CoV-2 Replication. *J Virol* 95(23): e0125721.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01257-21>

75. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, Péré H, Charbit B, Bonnet V, Chenevier-Gobeaux C, Breillat P, Carlier N, Gauzit R, Morbieu C, Pène F, Marin N, Roche N, Szwed TA, Merklings SH, Treluyer JM, Veyer D, Mouthon L, Blanc C, Tharaux PL, Rozenberg F, Fischer A, Duffy D, Rieux-Laucat F, Kernéis S, Terrier B (2020) Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 369(6504): 718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
76. Kouhpayeh H (2022) Clinical features predicting COVID-19 mortality risk. *Eur J Transl Myol* 32(2): 10268. <https://doi.org/10.4081/ejtm.2022.10268>
77. Schultze JL, Aschenbrenner AC (2021) COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* 184(7): 1671–1692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.029>
78. Nie Y, Mou L, Long Q, Deng D, Hu R, Cheng J, Wu J (2023) SARS-CoV-2 ORF3a positively regulates NF- κ B activity by enhancing IKK β -NEMO interaction. *Virus Res* 328: 199086. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199086>
79. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, Jordan TX, Oishi K, Panis M, Sachs D, Wang TT, Schwartz RE, Lim JK, Albrecht RA, tenOever BR (2020) Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* 181(5): 1036–1045.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>
80. Ren Y, Shu T, Wu D, Mu J, Wang C, Huang M, Han Y, Zhang XY, Zhou W, Qiu Y, Zhou X (2020) The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. *Cell Mol Immunol* 17(8): 881–883. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0485-9>
81. Zheng Z, Peng F, Xu B, Zhao J, Liu H, Peng J, Li Q, Jiang C, Zhou Y, Liu S, Ye C, Zhang P, Xing Y, Guo H, Tang W (2020) Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. *J Infect* 81(2): e16–e25. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.021>
82. Dinno KH 3rd, Leist SR, Schäfer A, Edwards CE, Martinez DR, Montgomery SA, West A, Yount BL Jr, Hou YJ, Adams LE, Gully KL, Brown AJ, Huang E, Bryant MD, Choong IC, Glenn JS, Gralinski LE, Sheahan TP, Baric RS (2020) A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature* 586(7830): 560–566. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2708-8>
83. Guaraldi G, Meschiari M, Cozzi-Lepri A, Milic J, Tonelli R, Menozzi M, Franceschini E, Cuomo G, Orlando G, Borghi V, Santoro A, Di Gaetano M, Puzzolante C, Carli F, Bedini A, Corradi L, Fantini R, Castaniere I, Tabbi L, Girardis M, Tedeschi S, Giannella M, Bartoletti M, Pascale R, Dolci G, Brugioni L, Pietrangelo A, Cossarizza A, Pea F, Cline E, Salvarani C, Massari M, Viale PL, Mussini C (2020) Tocilizumab in patients with severe COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol* 2(8): e474–e484. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30173-9](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30173-9)
84. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, Kunkel SL, Walz A, Hudson LD, Martin TR (1996) Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 154(3 Pt 1): 602–611. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.3.8810593>
85. Rahman A, Fazal F (2009) Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxid Redox Signal* 11(4): 823–839. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2204>
86. Song D, Ye X, Xu H, Liu SF (2009) Activation of endothelial intrinsic NF- κ B pathway impairs protein C anticoagulation mechanism and promotes coagulation in endotoxemic mice. *Blood* 114(12): 2521–2529. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-205914>
87. Sun X, Sun BL, Babicheva A, Vanderpool R, Oita RC, Casanova N, Tang H, Gupta A, Lynn H, Gupta G, Rischard F, Sammani S, Kempf CL, Moreno-Vinasco L, Ahmed M, Camp SM, Wang J, Desai AA, Yuan JX, Garcia JGN (2020) Direct Extracellular NAMPT Involvement in Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling. Transcriptional Regulation by SOX and HIF-2 α . *Am J Respir Cell Mol Biol* 63(1): 92–103. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0164OC>
88. Bime C, Casanova N, Oita RC, Ndukum J, Lynn H, Camp SM, Lussier Y, Abraham I, Carter D, Miller EJ, Mekontso-Dessap A, Downs CA, Garcia JGN (2019) Development of a biomarker mortality risk model in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 23(1): 410. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2697-x>
89. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R (2020) DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 20(2): 95–112. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>

90. Bermudez T, Sammani S, Song JH, Hernon VR, Kempf CL, Garcia AN, Burt J, Hufford M, Camp SM, Cress AE, Desai AA, Natarajan V, Jacobson JR, Dudek SM, Cancio LC, Alvarez J, Rafikov R, Li Y, Zhang DD, Casanova NG, Bime C, Garcia JGN (2022) eNAMPT neutralization reduces preclinical ARDS severity via rectified NFκB and Akt/mTORC2 signaling. *Sci Rep* 12(1): 696. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04444-9>
91. Zhu X, Huang B, Zhao F, Lian J, He L, Zhang Y, Ji L, Zhang J, Yan X, Zeng T, Ma C, Liang Y, Zhang C, Lin J (2023) p38-mediated FOXN3 phosphorylation modulates lung inflammation and injury through the NF-κB signaling pathway. *Nucl Acids Res* 51(5): 2195–2214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad057>
92. Шпагина ЛА, Котова ОС, Сараскина ЛЕ, Ермакова МА (2018) Особенности клеточно-молекулярных механизмов профессиональной хронической обструктивной болезни легких. *Сибирск мед обозр* 2 (110): 37–45. [Shpagina LA, Kotova OS, Saraskina LE, Ermakova MA (2018) Features of cellular and molecular mechanisms of occupational chronic obstructive pulmonary disease. *Sibirsk Med Obozr* 2 (110): 37–45. (In Russ)].
93. Дыгай АМ, Скурихин ЕГ, Пан ЭС (2022) Хроническая обструктивная болезнь лёгких: перспективы фармакологической регуляции стволовых клеток в клинике. М. РАН. [Dygay AM, Skurikhin EG, Pan ES (2022) Chronic obstructive pulmonary disease: prospects for pharmacological regulation of stem cells in the clinic. М. RAN. (In Russ)].
94. Sidletskaya K, Vitkina T, Denisenko Y (2020) The Role of Toll-Like Receptors 2 and 4 in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 15: 1481–1493. <https://doi.org/10.2147/COPD.S249131>
95. McGrath J, Stampfli M (2018) The immune system as a victim and aggressor in chronic obstructive pulmonary disease. *J Thorac Dis* 10: 2011–2017. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.05.63>
96. Wu Y, Li Z, Dong L, Li W, Wu Y, Wang J, Chen H, Liu H, Li M, Jin C, Huang H, Ying S, Li W, Shen H, Chen Z (2020) Inactivation of MTOR promotes autophagy-mediated epithelial injury in particulate matter-induced airway inflammation. *Autophagy* 16(3): 435–450. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1628536>
97. Chen Z, Wu Y, Wang P, Wu Y, Li Z, Zhao Y, Zhou J, Zhu C, Cao C, Mao Y, Xu F, Wang B, Cormier S, Ying S, Li W, Shen H (2016) Autophagy is essential for ultrafine particle-induced inflammation and mucus hyperproduction in airway epithelium. *Autophagy* 12(2): 297–311. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1124224>

Transcription Factor NF-κB: Role and Significance in the Neuroimmunoendocrine Regulation of Respiratory Function in Normal Conditions and in Lung Pathology

**Yu. I. Belova^{a, b}, E. S. Mironova^{a, c, *}, T. S. Zubareva^{a, c}, I. M. Kvetnoy^{a, b},
and P. K. Yablonsky^{a, b}**

^a St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^c Research Center “St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology”, St. Petersburg, Russian Federation

*e-mail: katerina.mironova@gerontology.ru

The problem of modern biomedicine is the elucidation of the multicomponent and multi-level mechanism of a single neuroimmunoendocrine regulation of physiological functions, which plays the role of a universal conductor of all life processes. Respiratory diseases lead in the structure of general morbidity among the population and remain one of the most pressing problems of modern healthcare. The spread of lung diseases is facilitated by lifestyle, air pollution, smoking, environment, infections, and genetic predisposition. Various risk factors can contribute to the development of pathologies such as pneumonia, lung cancer, asthma, chronic obstructive pulmonary disease and others. In addition, the rates of these diseases tend to increase every year. In this regard, verification and study of signaling molecules as factors involved in the neuroimmunoendocrine regulation of lung function in

normal and pathological conditions, which on the one hand can be considered as biomarkers of disease prognosis, and on the other as potential targets for targeted effective therapy, is an urgent task of modern translational biomedicine. This literature review is devoted to study of the one of the key participants role in the neuroimmunoendocrine regulation of homeostasis – the transcription factor NF- κ B in the regulation of respiratory function in health and the pathogenesis of lung diseases. Summarizing information on this topic is extremely important and promising for understanding the molecular mechanisms of the onset and course of diseases, and will also allow us to develop new approaches to targeted personalized therapy for socially significant pathologies: bronchial asthma, lung cancer, acute distress syndrome and COVID-19. A detailed study of the mechanisms of NF- κ B activation and its relationship with other signaling pathways will lead to solving the main task of translational biomedicine – the development of innovative methods for the treatment and prevention of human diseases, including pathology of the respiratory system.

Key words: NF- κ B, neuroimmunoendocrinology, respiratory system, inflammaging, lung disease

ОБЗОРЫ

КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ АСПРОСИНА

© 2024 г. В. В. Зинчук^{1,*}, Д. Ш. О. Аль-Джебур²

¹Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

²Гродненский государственный университет им. Янки Купалы, Гродно, Беларусь

*E-mail: zinchuk@grsmu.by

Поступила в редакцию 18.11.2023 г.

После доработки 25.12.2023 г.

Принята к публикации 25.12.2023 г.

В жировой ткани обнаружен новый гормон из группы адипокинов, названный аспросином, который является регулятором реакций организма на непродолжительное голодание, инициирует высвобождение глюкозы из печени и усиление аппетита, увеличивает общее количество запасов энергии в жировой ткани. Этот гормон, определяя биоэнергетический статус организма, влияет на содержание кислорода в тканях и соответственно на кислородтранспортную функцию крови при избыточной массе тела и инсулинорезистентности. У лиц с повышенным содержанием аспросина при избыточной массе и ожирением I степени, а также при инсулинорезистентности отмечается изменение положения кривой диссоциации оксигемоглобина, сопровождающееся повышением концентрации газотрансмиттеров монооксида азота и снижением уровня сероводорода. Этот фактор участвует в регуляции системы газотрансмиттеров и формировании механизмов транспорта кислорода крови. Вклад аспросина в формирование кислородного обеспечения и адаптационных резервов организма у лиц с метаболическими нарушениями отражает новый аспект механизма его действия.

Ключевые слова: аспросин, жировая клетчатка, избыточная масса, кровь, кислород, газотрансмиттер

DOI: 10.31857/S0869813924040033, **EDN:** COEPBJ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время избыточная масса тела, в частности, ожирение является одной из важнейших проблем, приводящих к ранней инвалидизации и высокой смертности, что связано с риском развития тяжелых гормональных и метаболических сдвигов в организме [1, 2]. Алиментарно-конституциональное ожирение является основной причиной патогенеза инсулинорезистентности (ИР) [3, 4], для которой характерно снижение индуцированного инсулином транспорта и метаболизма глюкозы в адипоцитах, скелетных мышцах и печени, что обусловлено нарушением передачи сигнала инсулина в тканях-мишенях вследствие ингибирования транслокации и регуляции действия глюкозных транспортеров 4-го типа (GLUT4), уменьшением числа рецепторов инсулина (IR) в миоцитах и адипоцитах, нарушением аутофосфорилирования рецепторов, снижением активности тирозинкиназы и фосфорилированием IRS [5, 6]. Адипопатия (дисфункция жировой ткани) приводит к развитию избыточной массы тела и,

как следствие, формированию ИР, сахарного диабета и целого ряда сопутствующих заболеваний.

Жировая клетчатка как эндокринный и паракринный орган способна влиять на другие органы и системы, а при избыточной массе тела происходит не только пролиферация и гипертрофия адипоцитов, но и их инфильтрация макрофагами с последующим развитием воспалительных реакций, вследствие чего изменяется ее метаболическая активность, что позволяет рассматривать ожирение как системный воспалительный процесс [7, 8]. Данная патология является хроническим мультифакторным заболеванием, проявляющимся избыточным накоплением жировой ткани и сопровождающимся повышенным риском сердечно-сосудистых событий, осложнений и сопутствующих заболеваний, а также целостностью нормального эндотелия, приводя к его дисфункции [9].

В жировой ткани происходит синтез существенного количества соединений, таких как адипокины, фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-6, белок хемоаттрактант моноцитов-1, белки ренин-ангиотензиновой системы, эти соединения способны воздействовать на функцию эндотелия [9]. В развитии метаболических нарушений, ведущих к избыточной массе тела, отводят существенную роль жировой ткани, которая представляет собой метаболически активный эндокринный орган, продуцирующий класс особых сигнальных веществ – адипокины [10]. Адипокиновый дисбаланс висцеральной жировой ткани сопряжен с повышенным риском развития кардиометаболических нарушений [11, 12]. Оценка роли различных адипокинов в развитии ожирения и сопутствующих ему нарушений является важной для проведения различных мероприятий по диагностике и профилактике эндокринной и сердечно-сосудистой патологии.

ХАРАКТЕРИСТИКА АСПРОСИНА

В 2016 г. Romere и соавт. [13] обнаружили новый гормон из группы адипокинов, названный аспросином, который является регулятором важнейших реакций организма на непродолжительное голодание, инициирует высвобождение глюкозы из печени и усиление аппетита, увеличивает общее количество запасов энергии в жировой ткани, а это, в свою очередь, изменяет регулирование энергетического гомеостаза, нейроэндокринных функций, метаболизма. Аспросин играет существенную роль в развитии ряда метаболических расстройств, в частности, связанных с ИР [14, 15]. Установлено, что однократная доза рекомбинантного аспросина, введенная подкожно мышам, приводит к гипергликемии и гиперинсулинемии, а его нейтрализация специфическими антителами улучшает резистентность к инсулину и снижает концентрацию глюкозы в плазме. Это позволяет предположить, что истощение запасов этого гормона представляет основу стратегии терапии сахарного диабета 2-го типа [13].

Характеристика локуса гена, отвечающего за образование аспросина, представлена на рис. 1. Ген, отвечающий за его образование (фибриллин 1), располагается в хромосоме 15q21.1 [16]. Он относится к семейству белков фибриллина. Ген фибриллин 1 содержит 66 экзонов (из них 65 кодирующих). Профибриллин-1 (2871 аминокислота) подвергается протеолитическому расщеплению сериновой протеазой фурином (КФ 3.4.21.94) с образованием двух отдельных белков: внеклеточный матричный компонент фибриллина 1 и белковый гормон. В состав аспросина входит 140 аминокислот, и он имеет молекулярную массу приблизительно 30 кДа. За его синтез ответственны два последних экзона профибрилина.

Наибольшая экспрессия профибрилина выявлена в белой жировой ткани. Синтезированный аспросин накапливается внутри адипоцитов и выделяется из них при снижении концентрации глюкозы в плазме, в связи с чем наибольшая его концентрация отмечается в утренний период, а прием пищи приводит к существенному снижению.

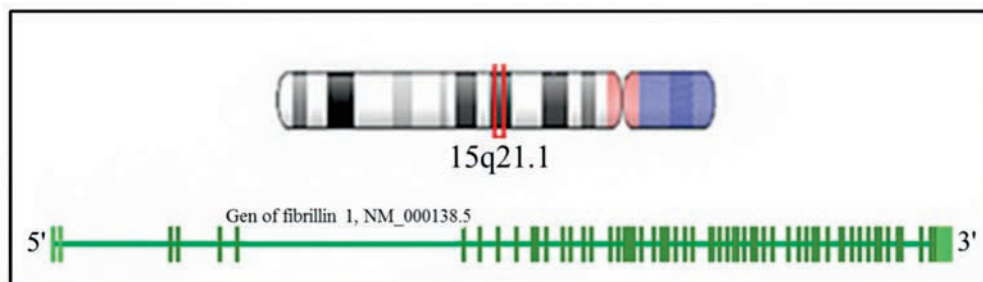


Рис. 1. Характеристика гена, кодирующего образование аспросина, – фибриллина 1.

В условиях голодания происходит повышение его уровня в плазме. Данный механизм работает по принципу отрицательной обратной связи. Инсулин является антагонистом по отношению к аспросину. Период его полувыведения – около 2 ч. Гендерных особенностей в содержании этого гормона не выявлено.

Некоторые центральные и периферические эффекты аспросина изложены на рис. 2 [14]. Действуя на периферические ткани-мишени, аспросин также может проникать через гематоэнцефалический барьер и оказывать влияние на центральную нервную систему. Данный фактор активирует нейроны агути-родственного пептида (AgRP) в дугообразном ядре гипоталамуса посредством связывания с рецептором протеинтирозинфосфатазы δ (Ptp δ), увеличивая аппетит и потребление пищи, что реализуется за счет активации кальций-зависимых калиевых каналов [17]. В печени аспросин связывается с OLFR734, усиливая выработку и высвобождение глюкозы через CREB-путь (цАМФ response element-binding protein). В β -клетках поджелудочной железы он связывается с Toll-подобным рецептором 4, способствуя воспалению и апоптозу этих клеток и снижая секрецию инсулина посредством стимуляции активности Jun-киназы и ингибирования уровня цАМФ. В стромальных клетках сердечной мышечной ткани аспросин предотвращает апоптоз и гибель этих клеток, вызванные окислительным стрессом за счет активации сигнального киназного пути ERK1/2-CO Δ 2. В скелетных мышцах аспросин активирует PKC δ /SERCA2-опосредованные пути стресса/воспаления эндоплазматического ретикулума, способствуя развитию ИР [14].

Увеличение его концентрации приводит к нарушениям многих важнейших функций, в частности, вызывает бесплодие, ожирение, ИР, метаболический синдром и аутоиммунные заболевания [18].

В состоянии покоя у пациентов с ожирением регистрируется более высокий уровень аспросина, а физические упражнения снижают его содержание [19]. Согласно данным ретроспективного исследования этот гормон может быть индикатором оценки ИР при синдроме поликистозных яичников [20]. Уровень аспросина в сыворотке крови увеличен у пациентов с нарушением обмена глюкозы и липидов, а нейрегулина-4 (адипокина, секретируемого бурой жировой тканью) снижен, положительно коррелируя со степенью тяжести течения сахарного диабета 2-го типа, гипертензией в анамнезе [21]. Проведена оценка влияния аспросина на воспалительные процессы в культурах адипоцитов и макрофагов на различных стадиях дифференцировки при стимуляции липополисахаридом. В данной работе было показано, что этот фактор способствует распространению умеренного воспаления, связанного с ожирением [22]. Уровень аспросина был ниже у пациентов с семейной средиземноморской лихорадкой и отрицательно коррелировал с уровнем С-реактивного белка в период приступа, свидетельствуя о его роли в противовоспалительном каскаде [23]. Однако многие аспекты действия данного гормона остаются неизученными, в частности, кислородзависимые процессы.

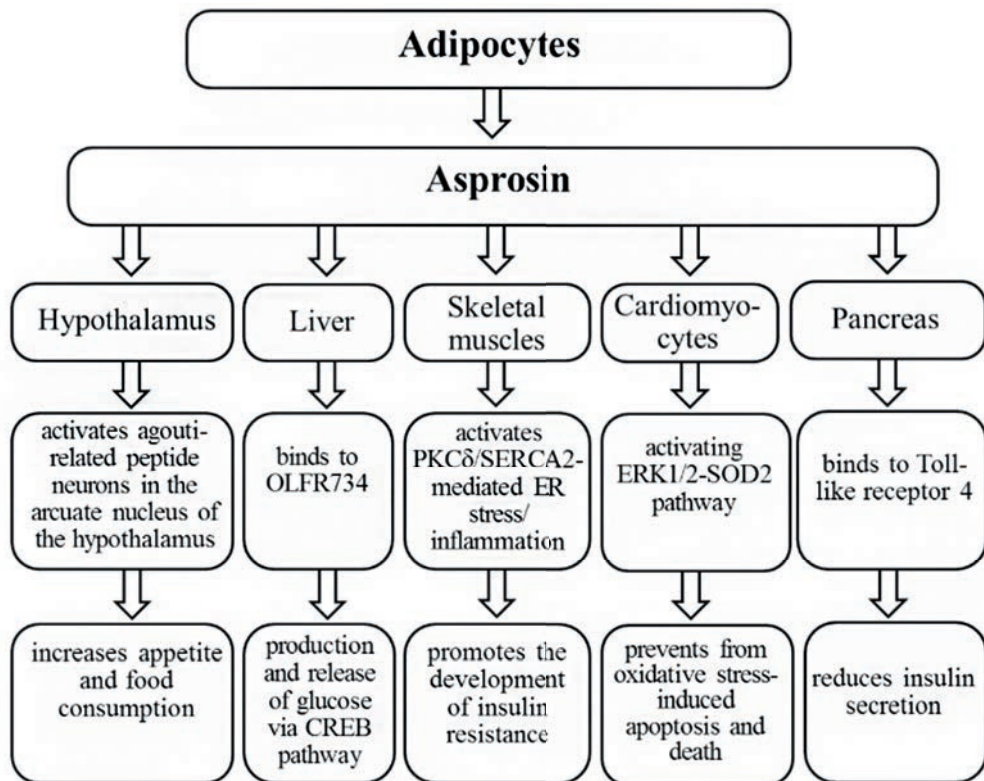


Рис. 2. Центральные и периферические эффекты аспросина.

АСПРОСИН И КИСЛОРОДТРАНСПОРТНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ

Жировая ткань секретирует огромное количество разнообразных физиологически активных веществ (неэтерифицированных жирных кислот, адипокинов, медиаторов воспаления), которые негативно действуют на инсулинозависимые ткани, индуцируя свободнорадикальное окисление, митохондриальную дисфункцию, гистотоксическую гипоксию [24]. Данные клетки реагируют на изменения уровня кислорода посредством активации генов, участвующих в ангиогенезе, метаболизме глюкозы и процессах пролиферации/выживания [25]. Аспросин является недавно идентифицированным адипокином, который играет важную регулируемую роль в метаболизме [26]. Несоответствие уровней образования про- и противовоспалительных адипокинов является одним из пусковых механизмов, влияющих на снижение функциональных возможностей кардиореспираторной системы [27].

Гипергликемия связана с явлением, называемым псевдогипоксия, которое характеризуется повышенным соотношением НАДФН/НАФ⁺ из-за увеличенного потока глюкозы через полиольный путь и нарушением окисления НАДФН [28]. Сахарный диабет не только вызывает гипоксию, но также нарушает передачу сигналов индуцибельного гипоксического фактора-1α, способность тканей адекватно реагировать на дефицит кислорода [29].

Аспросин ослабляет передачу сигналов инсулина и способствует развитию резистентности к нему в скелетных мышцах за счет усиления воспалительных процессов и стресса эндоплазматического ретикулума, однако он может также играть защитную

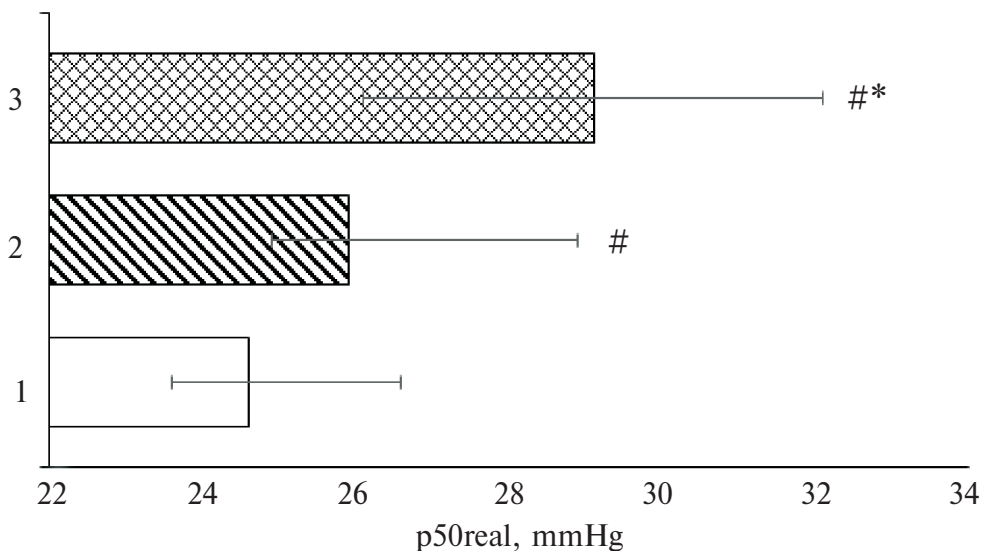


Рис. 3. Значение показателя сродства гемоглобина к кислороду $p50$ у здоровых лиц с нормальной массой тела (1), с избыточной массой тела (2) и с ожирением I степени (3).

Изменения статистически значимы по отношению к лицам с нормальной массой тела – #, с избыточной массой тела – *.

роль в кардиомиоцитах, подвергающихся воздействию гипоксии [5]. На клеточной модели кардиомиобластов показано, что аспросин предотвращает вызванную гипоксией гибель клеток и усиливает активность митохондриального дыхания [30]. Этот гормон ингибирует апоптоз и образование активных форм кислорода посредством активации пути ERK1/2-COD2, что повышает уровень антиоксидантов мезенхимальных стромальных клеток в модели ишемической болезни сердца [31]. Данный гормон способен модулировать функции митохондрий сердца и имеет важное прогностическое значение у пациентов с дилатационной кардиомиопатией [30]. При коронавирусной инфекции COVID-19 выявлено снижение уровня аспросина и метаболической активности, которое препятствует достаточной выработке энергии и усиливает окислительный стресс [15].

Эритроциты, наряду со своей базовой функцией доставки кислорода, являются активными регуляторами микрокровотока в соответствии с локальными метаболическими потребностями тканей, выполняя роль сенсора гипоксии и регулятора сосудистого тонуса на уровне резистивных элементов микроциркуляторной сети [32]. В нашем исследовании у лиц с избыточной массой тела и ожирением I степени [33], у которых была повышена концентрация аспросина [13.23 (11.85; 15.65), $p < 0.05$ и 29.86 (28.16; 32.83), $p < 0.05$, пмоль/л], в сравнении со здоровыми [8.6 (8.0; 9.2) пмоль/л], наблюдалось снижение степени насыщения кислородом венозной крови и его парциального давления в сравнении с исследуемыми с нормальным индексом массы тела, а также увеличение показателя сродства гемоглобина к кислороду $p50_{\text{реал}}$ до 25.9 (24.94; 28.96), $p < 0.05$ и 29.1 (25.14; 32.31), $p < 0.05$ в сравнении с исследуемыми лицами с нормальным индексом массы тела 24.6 (23.87; 26.7) мм рт. ст. (рис. 3), что отражает сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина к кислороду вправо. Ее смещение способствует росту потока кислорода в ткани у исследуемых пациентов с повышенным значением массы тела, что можно расценивать как механизм компенсации кислородной недостаточности.

ИР представляет собой такое патологическое состояние, при котором чувствительность ряда тканей (жировая, мышечная, печень) к инсулину снижается [34] и наиболее часто выявляется при ожирении, определенную роль в развитии которого играет увеличение синтеза адипокинов [35, 36]. Резистентность к инсулину, связанная с ожирением, индуцирует воспаление, дисфункцию адипоцитов, окислительный стресс и гипоксию [5]. Адаптационные процессы при гипоксии, контролируемые как центральными, так и межклеточными и внутриклеточными регуляторными механизмами, обеспечивают поддержание должного уровня метаболизма, определенный вклад в который вносит аспросин. При ИР данный гормон снижает чувствительность к инсулину скелетных мышц за счет активации протеинкиназы C/Ca^{2+} -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA2). Аспросин также способен через TLR4/JNK-опосредованный путь увеличивать продукцию активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов, вызывая, таким образом, нарушение механизмов кислородного обеспечения [31]. Показано увеличение концентрации аспросина у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и коронавирусной инфекцией при снижении насыщения крови кислородом (до 70%), что может быть обусловлено высвобождением глюкозы из печени для удовлетворения потребности организма в энергии [37].

Согласно нашим исследованиям, концентрация аспросина в плазме крови у лиц с ИР при нормальном индексе массы тела (20.95 (18.87; 25.11), $p < 0.05$, пмоль/л) была значительно выше, чем у здоровых (8.6 (8.0; 9.2) пмоль/л), а при избыточной массе тела и ожирении I степени этот параметр имел еще более высокие значения: 40.26 (37.36; 41.26), $p < 0.05$ и 66.81 (62.33; 69.6), $p < 0.05$, пмоль/л [38]. У исследуемых с ИР, с ожирением I степени с повышенным содержанием аспросина наблюдалось снижение степени насыщения кислородом венозной крови и его парциального давления в сравнении с исследуемыми с нормальной и избыточной массой тела. Выявлено увеличение показателя сродства гемоглобина к кислороду $p50_{\text{реал}}$ у лиц при ИР с нормальной массой тела в сравнении со здоровыми, что характеризуется сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина к кислороду вправо, а при ИР у лиц с избыточной массой тела и при ожирении I степени выявлено уменьшение $p50_{\text{реал}}$ (рис. 4) [38]. Происходящий сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево уменьшает массоперенос кислорода в ткани, что отражает декомпенсацию механизмов кислородного гомеостаза.

Аэробный потенциал организма определяется экономичностью функционирования системы кровообращения как на уровне макро-, так и микроциркуляции и эффективностью реализации кислородтранспортной функции крови [39]. Кислородсвязывающие свойства крови, определяя степень ее деоксигенации, являются важным звеном регуляции энергетики организма, и наоборот, их модификация в ответ на изменение уровня аспросина влияет на метаболические процессы. Показано значение такого адипокина, как лептин, для формирования механизмов транспорта кислорода кровью при метаболическом синдроме и инфаркте миокарда как за счет действия на механизмы внешнего дыхания и кровообращения, L-аргинин-NO-системы, так и опосредованно через модификацию кислородтранспортной функции крови (гемопозз) [40], что дает основание предполагать с учетом наших результатов вклад в кислородзависимые процессы и других адипокинов, а именно, аспросина.

Этот гормон влияет на процессы энергообмена, функциональное состояние организма и, соответственно, на его кислородный гомеостаз. Можно предположить, что данный пептид, определяя энергозависимые процессы организма, влияет на внутриклеточное содержание кислорода и, соответственно, на механизмы транспорта кислорода кровью, в частности, на ее кислородсвязывающие свойства.

АСПРОСИН И ГАЗОТРАНСМИТТЕРЫ (NO И H_2S)

Семейство эндогенных газообразных сигнальных молекул (NO и H_2S) обеспечивает множество жизненно важных физиологических функций, но они могут действовать

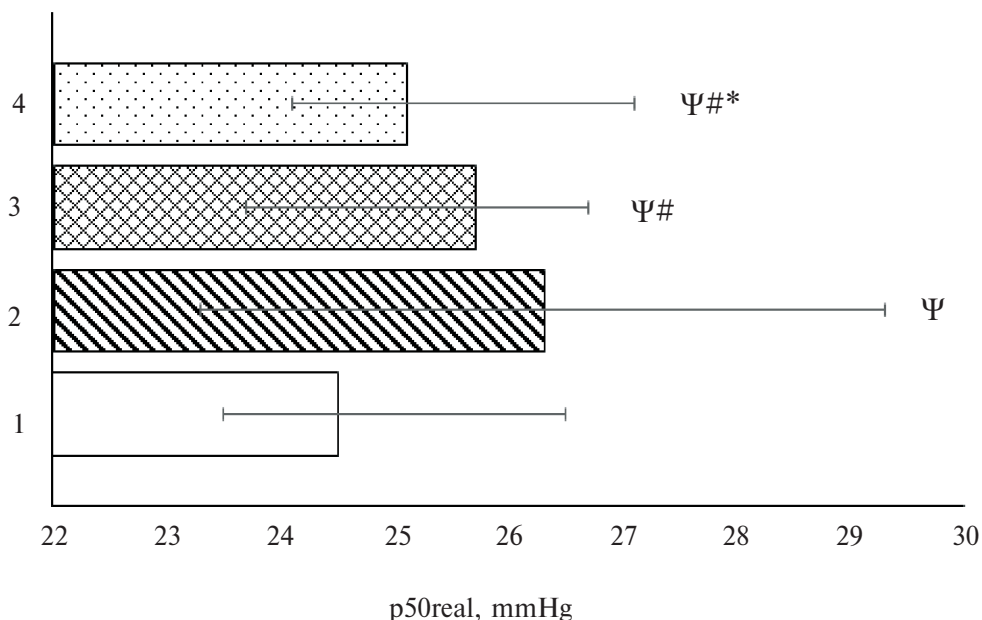


Рис. 4. Значение показателя сродства гемоглобина к кислороду $p50$ при инсулинорезистентности: здоровые (1), лица с нормальной массой тела (2), с избыточной массой тела (3) и с ожирением I степени (4). Изменения статистически значимы по отношению к здоровым – Ψ, лицам с нормальной массой тела – #, с избыточной массой тела – *.

как «друг или враг» в различных системах организма [41]. Газотрансмиттеры эндогенно синтезируются клетками организма и являются сигнальными молекулами, выполняющими как аутокринную, так и паракринную регуляцию во многих тканях и органах, участвуя в регуляции кровообращения, включая сосудистый компонент, а также и текущую по сосудам кровь, управляя ее текучестью и транспортным потенциалом, особенно эритроцитов [42]. Аспросин повышал уровень экспрессии белка спартина в эндотелиальных клетках микрососудов сердца, снижал продукцию активных форм кислорода, уменьшал апоптоз и увеличивал продукцию газотрансмиттера NO [43].

При избыточной массе фактор некроза опухоли- α , образующийся либо в мелких сосудах, либо в периваскулярной жировой ткани, стимулирует генерацию активных форм кислорода в основном за счет активации НАДФН-оксидазы, это снижает доступность монооксида азота, что может быть в основе механизма, с помощью которого фактор некроза опухоли- α изменяет функционирование системы эндотелин-1/NO [9]. Умеренный синтез NO повышает эффективность митохондрий, одновременно улучшая использование O_2 и увеличивая выработку энергии в организме, а долгосрочная биоэнергетическая емкость может быть увеличена из-за роста активных форм азота, которые участвуют в адаптивной клеточной окислительно-восстановительной передаче сигналов через аденозинмонофосфат-активируемую протеинкиназу, рецепторы активируемых пероксисомными пролифераторами гипоксического индуцибельного фактора 1- α и NF- κ B [44]. Эффекты газомедиаторов могут быть опосредованы их взаимодействием друг с другом, осуществляемым как на уровне регуляции ферментов синтеза, так и мишеней их действия: сероводород может ингибировать активность ферментов, синтезирующих NO, а донор NO (нитропруссид натрия) усиливает экспрессию цистатионин- γ -лиазы и цистатионин- β -синтазы [32].

Нами были получены данные, что у здоровых лиц при избыточной массе тела и при ожирении I степени концентрация нитрат/нитритов возрастает, а уровень сероводорода снижается [33]. Активация NO-ергической системы за счет экспрессии индуцибельной изоформы NO-синтазы вносит вклад в дисбаланс регуляции углеводного обмена [29]. Согласно нашему исследованию, возможно влияние гормона аспросина на функциональное состояние организма через вклад в механизмы продуцирования газотрансмиттеров монооксида азота и сероводорода.

Газовый мессенджер сероводород играет важную роль с точки зрения передачи клеточного сигнала и модуляции деятельности сердечно-сосудистой системы и многих органов, в частности, печени, сероводород также воздействует на митохондрии, влияя на энергетический обмен [21]. Сероводород может влиять на секрецию инсулина и уровень циркулирующей глюкозы, его введение β -клеточным линиям ослабляет секрецию инсулина, вызванную высоким уровнем глюкозы, а также влияет на активацию АТФ-чувствительных калиевых каналов, ингибирование синтеза АТФ и инактивацию кальцийзависимых каналов L-типа [45]. Этот фактор способствует дифференцировке стволовых клеток, полученных из жировой ткани, в нейрональные клетки, экспрессирующие функциональные потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы, включая NO-опосредованный сигнальный каскад [46]. В зрелых адипоцитах доноры сероводорода дозозависимо ингибируют базальное и инсулин-стимулированное поглощение глюкозы адипоцитами, а ингибиторы его синтеза действуют наоборот [47].

Сероводород может регулировать метаболизм глюкозы и липидов в адипоцитах, влияя на поглощение ими энергии и ее сохранение в виде липидов [47]. Эта молекула является ключевым компонентом метаболизма глюкозы в печени, регулируя ее поглощение, накопление гликогена и глюконеогенез [45]. Кроме того, выявлен новый сигнальный путь, который регулирует способность переноса кислорода в эритроцитах и реализуется через участие газотрансмиттера сероводорода в продукции 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах с последующим повышением сродства гемоглобина к кислороду [48]. Нами было показано, что у лиц с ожирением I степени с высоким уровнем аспросина содержание монооксида азота было наиболее увеличенным и составляло 29.52 (27.24; 32.85) мкмоль/л, а концентрация сероводорода уменьшалась до 9.38 (8.64; 10.81), $p < 0.05$, мкмоль/л, что было существенно ниже в сравнении с исследуемыми при ИР с нормальной массой тела [38].

Таким образом, аспросин способен влиять на систему газотрансмиттеров, что имеет важное значение для формирования кислородтранспортной функции крови пациентов с избыточной массой тела.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ АСПРОСИНА НА КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ

Система газотрансмиттеров оказывает модулирующее действие на кислородтранспортную функцию крови при различных условиях кислородного обеспечения, сопровождающегося развитием гипоксии [49]. Эти эффекты реализуются через различные уровни регуляции эритроцитарных и системных механизмов. При высоком сродстве гемоглобина к кислороду у лиц с генетической мутацией его структуры во время гипоксии и физической нагрузки наблюдается дисбаланс механизмов регуляции кардиореспираторной системы [50]. Пересечение на тех или иных уровнях NO- и H_2S -зависимых сигнальных каскадов может приводить как к взаимному активированию, так и к ингибированию этих систем, в результате чего может быть вариативность физиологических реакций со стороны отдельных клеток, органов и систем. В частности, сократительные реакции гладких мышц сосудов при метаболическом синдроме обусловлены взаимодействием эффектов NO и H_2S , последний усиливает вазорелаксирующее действие NO,

препятствуя деградации NO-синтазы, в то время как первый увеличивает активность и экспрессию ферментов, вырабатывающих H_2S [51]. Разнонаправленные изменения содержания данных газотрансмиттеров могут быть обусловлены конкуренцией за места связывания SH-групп цистеина при S-нитрозилировании и S-сульфидировании либо взаимодействием H_2S с NO с образованием тиазотистой кислоты [52].

Выявленные в нашем исследовании изменения концентрации газотрансмиттеров у лиц с различной концентрацией аспросина, очевидно, обусловлены дисбалансом синтеза различных адипокинов, что важно для формирования механизмов транспорта кислорода кровью.

При ожирении характерна, как ни парадоксально, гипероксия жировой ткани даже при наличии снижения кровотока в ней, что может быть объяснено уменьшением потребления кислорода развитием воспаления, в результате чего развивается местный ответ, который в макрофагах и адипоцитах может быть причиной хронического воспаления [9]. Физиологические уровни газотрансмиттера NO играют ключевую роль в поддержании метаболической функции жировой ткани [29]. Адипокины, передающие сигнал к мишеням (сосуды, мозг, печень, мышцы), сопряжены с L-аргинин-NO-зависимым сигнальным каскадом, влияющим на патогенез метаболических нарушений [53].

Газотрансмиттер H_2S , продуцируемый периферическими тканями, оказывает ингибирующее действие на синтез 2,3-дифосфоглицерата и изменение сродства гемоглобина к кислороду через высвобождение гемоглобина из мембраны в цитозоль и усилению прикрепления дифосфоглицератмутаза к мембране, связанного с S-сульфидированием гемоглобина [48]. Модификация гемоглобина за счет взаимодействия с газотрансмиттерами участвует в формировании оптимального кислородного режима, внутриэритроцитарной системы регуляции кислородсвязывающих свойств крови, наряду с pH, 2,3-дифосфоглицератом [54, 55]. Выявленные изменения кислородсвязывающих свойств гемоглобина имеют значение для кислородного обеспечения при избыточной массе тела.

Можно предположить, что аспросин влияет на образование газотрансмиттеров монооксида азота и сероводорода при нарушениях углеводного метаболизма, что обуславливает изменения кислородсвязывающих свойств крови. Данный гормон влияет на процессы энергообмена организма и, соответственно, его кислородное обеспечение (рис. 5). Аспросин, определяя энергозависимые процессы клетки, влияет на внутриклеточное содержание кислорода и, соответственно, на кислородсвязывающие свойства крови. Участие гормона аспросина в регуляции системы газотрансмиттеров и в формировании механизмов транспорта кислорода крови важно для формирования кислородного обеспечения, для повышения адаптационного потенциала у лиц с метаболическими нарушениями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аспросин влияет на общее количество запасов энергии в жировой ткани, а это, в свою очередь, изменяет регулирование энергетического гомеостаза, нейроэндокринных функций, метаболизма. Участие этого пептида в регуляции системы газотрансмиттеров и в формировании механизмов транспорта кислорода крови важно при развитии метаболических нарушений. Вклад аспросина в регуляцию кислородсвязывающих свойств крови имеет значение для формирования кислородного обеспечения и адаптационных резервов у лиц с метаболическими нарушениями, отражая новый аспект механизма его действия при избыточной массе тела.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Концепция (В. В. З., Д. Ш. О. А.), написание текста (В. В. З., Д. Ш. О. А.), оформление рисунков (Д. Ш. О. А.), редактирование рукописи (В. В. З., Д. Ш. О. А.), критический пересмотр на

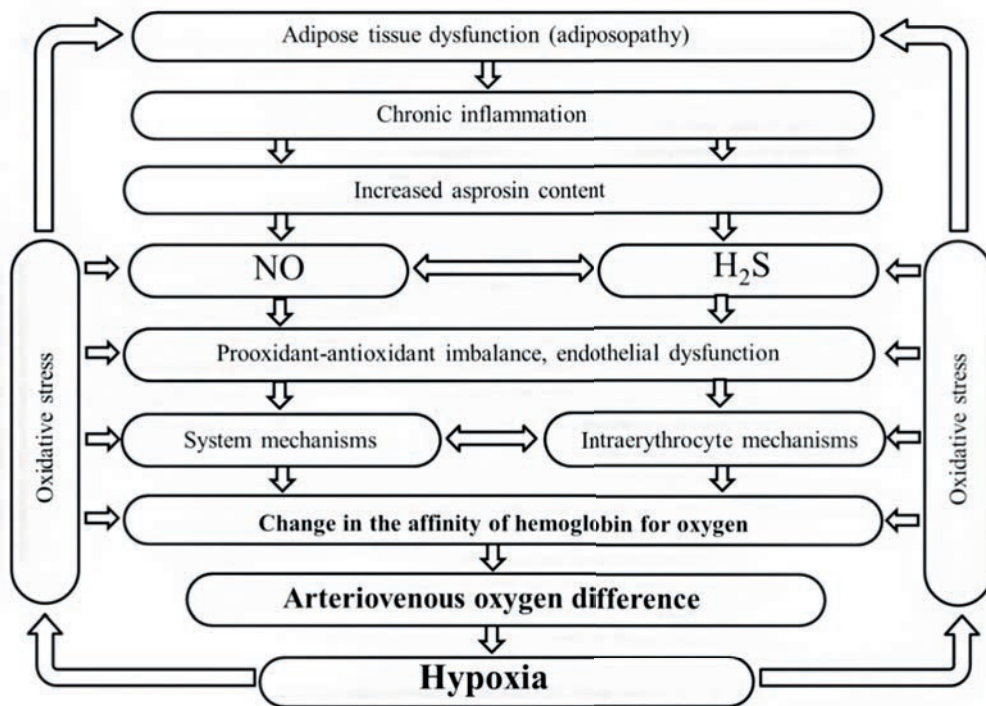


Рис. 5. Вклад адипонектина в развитие нарушений кислородного обеспечения.

предмет интеллектуального содержания (Д. Ш. О. А.), утверждение финального варианта статьи для публикации (В. В. З., Д. Ш. О. А.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Государственной программы научных исследований Республики Беларусь. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Панова ЕИ, Пиманкина МС, Каратаева ОВ (2020) Клинические особенности и инсулино-резистентность у мужчин с метаболически нездоровым фенотипом ожирения. *Арх внутр мед* 10(4): 288–295. [Panova EI, Pimankina MS, Karataeva OV (2020) Clinical Features and Insulin Resistance in Men with a Metabolically Unhealthy Obesity Phenotype. *Arch of Int Med* 10(4): 288–295. (In Russ)]. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2020-10-4-288-295>
2. Vallis M, Jin S, Klimek-Abercrombie A, Bunko A, Kukaswadia A, Neish CS, Ivers NM (2023) Understanding strategies to improve medication adherence among persons with type 2 diabetes: A scoping review. *Diabet Med* 40(1): 1–12. <https://doi.org/10.1111/dme.14941>

3. Sasaki N, Maeda R, Ozono R, Yoshimura K, Nakano Y, Higashi Y (2022) Adipose tissue insulin resistance predicts the incidence of hypertension: The Hiroshima Study on Glucose Metabolism and Cardiovascular Diseases. *Hypertens Res* 45(11): 1763–1771. <https://doi.org/10.1038/s41440-022-00987-0>
4. Singh M, Hung ES, Cullum A, Allen RE, Aggett PJ, Dyson P, Forouhi NG, Greenwood DC, Pryke R, Taylor R, Twenefour D, Waxman R, Young IS (2022) Lower carbohydrate diets for adults with type 2 diabetes. *Br J Nutr* 127(9): 1352–1357. <https://doi.org/10.1017/S0007114521002373>
5. Shabir K, Brown JE, Afzal I, Gharane S, Weickert MO, Barber TM, Kyrou I, Randeva HS (2021) Asprosin, a novel pleiotropic adipokine implicated in fasting and obesity-related cardio-metabolic disease: Comprehensive review of preclinical and clinical evidence. *Cytokine Growth Factor Rev* 60: 120–132. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.05.002>
6. Lee SH, Park SY, Choi CS (2022) Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab J* 46(1): 15–37. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>
7. Свеклина ТС, Таланцева МС, Барсуков АВ (2013) Метаболический синдром и воспаление: актуальные вопросы патогенеза. *Клин лаб диагн* 3: 7–10. [Sveklina TS, Talantseva MS, Barsukov AV (2013) The metabolic syndrome and inflammation: actual issues of pathogenesis. *Klin Lab Diagn* 3: 7–10. (In Russ)]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23808015/>
8. Uchiyama T, Ota H, Ohbayashi C, Takasawa S (2021) Effects of Intermittent Hypoxia on Cytokine Expression Involved in Insulin Resistance. *Int J Mol Sci* 22(23): 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms222312898>
9. Шишкин АН, Князева АИ (2022) Эндотелиальная дисфункция у больных с ожирением. Регион кровооб и микроцирк 21(3): 4–11. [Shishkin AN, Kniazeva AI (2022) Endothelial dysfunction in patients with obesity. *Regional blood circulat and microcirculat* 21(3): 4–11. (In Russ)]. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2022-21-3-4-11>
10. Салимханов РХ, Шарифуллин ВР, Кушнарева ЮР, Каде АХ, Поляков ПП (2020) Роль и значение аспросина в регуляции пищевого поведения и метаболизма. *Кубанск науч мед вестн* 27(1): 96–104. [Salimkhanov RH, Sharifullin VR, Kushnareva YR, Kade AKh, Polyakov PP (2020) Role and significance of asprosin in feeding behaviour and metabolism. *Kuban Sci Med Bul* 27(1): 96–104. (In Russ)]. <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2020-27-1-96-104>
11. Разино ЮИ, Щербакова ЛВ, Облаухова ВИ, Полонская ЯВ, Стахнева ЕМ, Кузьминых НА, Каштанова ЕВ (2021) Адипокины крови у молодых людей с ранней ишемической болезнью сердца на фоне абдоминального ожирения. *Кардиология* 61(4): 32–38. [Ragino YuI, Shcherbakova LV, Oblaukhova VI, Polonskaya YV, Stakhneva EM, Kuzminykh NA, Kashtanova EV (2021) Blood adipokins in young people with early ischemic heart disease on the background of abdominal obesity. *Cardiology* 61(4): 32–38. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18087/cardio.2021.4.n1369>
12. Hariharan R, Odjidja EN, Scott D, Shivappa N, Hébert JR, Hodge A, de Courten B (2022) The dietary inflammatory index, obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular risk factors and diseases. *Obes Rev* 23(1): 1–18. <https://doi.org/10.1111/obr.13349>
13. Romere C, Duerrschmid C, Bournat J, Constable P, Jain M, Xia F, Saha PK, Del Solar M, Zhu B, York B, Sarkar P, Rendon DA, Gaber MW, LeMaire SA, Coselli JS, Milewicz DM, Sutton VR, Butte NF, Moore DD, Chopra AR (2016) Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell* 165(3): 566–579. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.063>
14. Yuan M, Li W, Zhu Y, Yu B, Wu J (2020) Asprosin: A Novel Player in Metabolic Diseases. *Front Endocrinol* 11: 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00064>
15. Seyhanli ES, Koyuncu I, Yasak IH, Demir HA, Temiz E (2022) Asprosin and Oxidative Stress Level in COVID-19 Patients. *Clin Lab* 68(1): 35–42. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2021.210423>
16. Ovali MA, Bozgeyik I (2022) Asprosin, a C-Terminal Cleavage Product of Fibrillin 1 Encoded by the *FBN1* Gene, in Health and Disease. *Mol Syndromol* 13(3): 175–183. <https://doi.org/10.1159/000520333>
17. Feng B, Liu H, Mishra I, Duerrschmid C, Gao P, Xu P, Wang C, He Y (2023) Asprosin promotes feeding through SK channel-dependent activation of AgRP neurons. *Sci Adv* 9(8): 1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq6718>
18. Liu L, Liu Y, Huang M, Zhang M, Zhu C, Chen X, Bennett S, Xu J, Zou J (2022) The effects of asprosin on exercise-intervention in metabolic diseases. *Front Physiol* 13: 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.907358>

19. *Ceylan Hİ, Öztürk ME, Öztürk D, Silva AF, Albayrak M, Saygın Ö, Eken Ö, Clemente FM, Nobari H* (2023) Acute effect of moderate and high-intensity interval exercises on asprosin and BDNF levels in inactive normal weight and obese individuals. *Sci Rep* 13(1): 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-34278-6>
20. *Zhu L, Wang L* (2023) Serum asprosin levels are increased and associated with insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome: A retrospective case-control study. *Medicine (Baltimore)* 102(15): 1–5.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000033526>
21. *Zhong M, Tian X, Sun Q, Li L, Lu Y, Feng Z, Gao Y, Li S* (2023) Correlation of asprosin and Nrg-4 with type 2 diabetes mellitus complicated with coronary heart disease and the diagnostic value. *BMC Endocr Disord* 23(1): 1–8.
<https://doi.org/10.1186/s12902-023-01311-8>
22. *Mazur-Bialy AI* (2023) Asprosin Enhances Cytokine Production by a Co-Culture of Fully Differentiated Mature Adipocytes and Macrophages Leading to the Exacerbation of the Condition Typical of Obesity-Related Inflammation. *Int J Mol Sci* 24(6): 1–11.
<https://doi.org/10.3390/ijms24065745>
23. *Sipahioglu H, Sen O, Koyuncu S, Kuzugüden S* (2023) Serum Asprosin Level as a New Biomarker in Differentiating Familial Mediterranean Fever Attacks. *Cureus* 15(2): 1–8.
<https://doi.org/10.7759/cureus.35342>
24. *Kade AX, Чабанец ЕА, Занин СА, Поляков ПП* (2022) Дисфункция жировой ткани (адипозопатия) как основной механизм метаболического синдрома. *Вопр питания* 91(1): 27–36. [Kade AKh, Chabanets EA, Zanin SA, Polyakov PP (2022) Sick fat (adiposopathy) as the main contributor to metabolic syndrome. *Vopr pitaniia (Problems of Nutrition)* 91(1): 27–36. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33029/0042-8833-2022-91-1-27-36>
25. *Della Rocca Y, Fonticoli L, Rajan TS, Trubiani O, Caputi S, Diomede F, Pizzicannella J, Marconi GD* (2022) Hypoxia: molecular pathophysiological mechanisms in human diseases. *J Physiol Biochem* 78(4): 739–752.
<https://doi.org/10.1007/s13105-022-00912-6>
26. *You M, Liu Y, Wang B, Li L, Zhang H, He H, Zhou Q, Cao T, Wang L, Zhao Z, Zhu Z, Gao P, Yan Z* (2022) Asprosin induces vascular endothelial-to-mesenchymal transition in diabetic lower extremity peripheral artery disease. *Cardiovasc Diabetol* 21(1): 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s12933-022-01457-0>
27. *Венгржиновская ОИ, Бондаренко ИЗ, Шацкая ОА, Никанкина ЛВ, Калашиников ВЮ, Шестакова МВ, Мокрышева НГ* (2022) Адипокины и кардиореспираторная система у молодых пациентов с сахарным диабетом 1-го типа. *Терапевт арх* 94(10): 1143–1148. [Vengrzhinovskaya OI, Bondarenko IZ, Shatskaya OA, Nikankina LV, Kalashnikov VYu, Shestakova MV, Mokrysheva NG (2022) Adipokines and the cardiorespiratory system in young patients with type 1 diabetes mellitus. *Terapevt Arkh* 94(10): 1143–1148. (In Russ)].
<https://doi.org/10.26442/00403660.2022.10.201889>
28. *Cerychova R, Pavlinkova G* (2018) HIF-1, Metabolism, and diabetes in the embryonic and adult heart. *Front Endocrinol* 9: 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00460>
29. *Куркин ДВ, Абросимова ЕЕ, Бакулин ДА, Ковалев НС, Дубровина МА, Борисов АВ, Петров ВИ, Тюреньков ИН* (2022) Роль NO-эргической системы в регуляции углеводного обмена и развитии сахарного диабета. *Усп физиол наук* 53(1): 88–104. [Kurkin DV, Abrosimova EE, Bakulin DA, Kovalev NS, Dubrovina MA, Borisov AV, Petrov VI, Tyurenkov IN (2022) The role of the NO-ergic system in the regulation of carbohydrate metabolism and the development of diabetes mellitus. *Progr Physiol Sci* 53(1): 88–104. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0301179822010052>
30. *Wen MS, Wang CY, Yeh JK, Chen CC, Tsai ML, Ho MY, Hung KC, Hsieh IC* (2020) The role of asprosin in patients with dilated cardiomyopathy. *BMC Cardiovasc Disord* 20(1): 1–8.
<https://doi.org/10.1186/s12872-020-01680-1>
31. *Zhang Z, Tan Y, Zhu L, Zhang B, Feng P, Gao E, Xu C, Wang X, Yi W, Sun Y* (2019) Asprosin improves the survival of mesenchymal stromal cells in myocardial infarction by inhibiting apoptosis via the activated ERK1/2-SOD2 pathway. *Life Sci* 231: 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116554>
32. *Тихомирова ИА, Петроченко ЕП, Петроченко АС* (2021) Сероводород как сигнальная молекула в сердечно-сосудистой системе. *Регион кровообр и микроцирк* 20(1): 5–16. [Tikhomirova IA, Petrochenko EP, Petrochenko AS (2021) Hydrogen sulfide as a signaling molecule in the cardiovascular system. *Region Blood Circulat Microcirculat* 20(1): 5–16. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2021-20-1-5-16>
33. *Зинчук ВВ, Аль-Джебур ДШО, Глуткина НВ* (2023) Роль аспросина в регуляции механизмов транспорта кислорода кровью и системы газотрансмиттеров у мужчин с различным

- индексом массы тела. Физиол чел 49(4): 101–107. [Zinchuk VV, Al-Jebur JSO, Glutkina NV (2023) The role of asprosin in the regulation of the mechanisms of oxygen transport in the blood and the gasotransmitter system in men with different body mass index. Human Physiol 49(4): 101–107. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S013116462260077X>
34. Lei WS, Kindler JM (2022) Insulin resistance and skeletal health. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 29(4): 343–349.
<https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000738>
35. Kosmas CE, Bousvarou MD, Kostara CE, Papakonstantinou EJ, Salamou E, Guzman E (2023) Insulin resistance and cardiovascular disease. J Int Med Res 51(3): 1–49.
<https://doi.org/doi:10.1177/03000605231164548>
36. Terzo S, Amato A, Mulè F (2021) From obesity to Alzheimer's disease through insulin resistance. J Diabetes Complicat 35(11): 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2021.108026>
37. Karagoz ZK, Aydin S (2022) Effects of oxygen saturation on the hypoxia-inducible factor-1 α , subfatin, asprosin, irisin, c-reactive protein, maresin-1, and diamine oxidase in diabetic patients with COVID-19. Eur Rev Med Pharmacol Sci 26: 9489–9501.
<https://doi.org/10.26355/eurrev.202212.30701>
38. Зинчук ВВ, Аль-Джебур ДШО, Глуткина НВ (2023) Кислородсвязывающие свойства крови при инсулинорезистентности с различным содержанием аспросина. Биомед хим 69(2): 133–139. [Zinchuk VV, Al-Jebur JSO, Glutkina NV (2023) Oxygen-binding properties of blood in insulin resistance with different asprosin content. Biomed Khim 69(2): 133–139. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18097/PBMC20236902133>
39. Михайлов ПВ, Остроумов РС, Тихомирова ИА, Муравьев АВ, Осетров ИА (2022) Исследование микроциркуляции и реологии крови у лиц с разным уровнем максимального потребления кислорода. Физиол человека 48(4): 93–102. [Mikhailov PV, Ostroumov RS, Tikhomirova IA, Muravyov AV, Osetrov IA (2022) Study of microcirculation and blood rheology in persons with different levels of maximum oxygen consumption. Human Physiol 48(4): 93–102. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0131164622040075>
40. Глуткина НВ (2013) Уровень лептина и показатели транспорта кислорода у пациентов с перенесенным инфарктом миокарда в сочетании с сахарным диабетом 2-го типа и метаболическим синдромом. Новости мед-биол наук 8(3): 37–41. [Glutkina NV (2013) Leptin levels and oxygen transport parameters in patients with myocardial infarction in combination with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. News Biomed Sci 8(3): 37–41. (In Russ)].
<https://www.library.ru/item.asp?id=53836987>
41. Ranjana M, Sunil D (2022) Naphthalimide derivatives as fluorescent probes for imaging endogenous gasotransmitters. Chem Biol Interact 363: 110022.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110022>
42. Муравьев АВ (2021) Роль газовых медиаторов (CO, NO и H₂S) в регуляции кровообращения: анализ участия микрореологии клеток крови. Регион кровообр и микроцирк 20(1): 91–99. [Muravyov AV (2021) The role of gaseous mediators (CO, NO and H₂S) in the regulation of blood circulation: analysis of the participation of blood cell microrheology. Region Blood Circulat and Microcirculat 20(1): 91–99. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2021-20-1-91-99>
43. Chen S, Wang X, Qiu CM, Hou JN, Wei XY, Xiang CX, Tang MY, Zhang R, Pei HF (2019) Study of the role and mechanism of asprosin/spartin pathway in cardiac microvascular endothelial injury induced by diabete mellitus. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 50(6): 827–834.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31880113/>
44. Pappas G, Wilkinson ML, Gow AJ (2023) Nitric oxide regulation of cellular metabolism: Adaptive tuning of cellular energy. Nitric Oxide 131: 8–17.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2022.11.006>
45. Munteanu C, Rotariu M, Turnea M, Dogaru G, Popescu C, Spînu A, Andone I, Postoiu R, Ionescu EV, Oprea C, Albadi I, Onose G (2022) Recent Advances in Molecular Research on Hydrogen Sulfide (H₂S) Role in Diabetes Mellitus (DM)-A Systematic Review. Int J Mol Sci 23(12): 1–26.
<https://doi.org/10.3390/ijms23126720>
46. Fujimoto S, Satoh A, Suzuki T, Miyazaki Y, Tanaka K, Usami M, Takizawa T (2022) Hydrogen sulfide potently promotes neuronal differentiation of adipose tissue-derived stem cells involving nitric oxide-mediated signaling cascade with the aid of cAMP-elevating agents. Nitric Oxide 127: 10–17.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2022.07.003>
47. Qi W, Man L, Suguro S, Zhao Y, Quan H, Huang C, Ma H, Guan H, Zhu Y (2022) Endocrine effects of three common gas signaling molecules in humans: A literature review. Front Endocrinol 13: 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1074638>

48. 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 Erythrocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2021: 1–16. <https://doi.org/10.1155/2021/8877691>
49. Зинчук ВВ (2021) Кислородтранспортная функция крови и газотрансмиттер сероводород. Усп физиол наук 52(3): 41–55. [Zinchuk VV (2021) Oxygen transport functions of blood and hydrogen sulfide gas transmitter. *Usp fiziol nauk* 52(3): 41–55. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0301179821030085>
50. 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>
51. Бирулина ЮГ, Иванов ВВ, Буйко ЕЕ, Габитова ИО, Ковалев ИВ, Носарев АВ, Смаглий ЛВ, Гусакова СВ (2021) Роль H₂S в регуляции сосудистого тонуса при метаболических нарушениях. Бюл экспер биол мед 171(4): 436–440. [Birulina YG, Ivanov VV, Buyko EE, Gabitova IO, Kovalev IV, Nosarev AV, Smagliy LV, Gusakova SV (2021) Role of H₂S in regulation of vascular tone in metabolic disorders. *Bull Exp Biol Med* 171(4): 436–440. (In Russ)]. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-171-4-436-440>
52. 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>
53. Кузнецова ЛА (2021) Метаболический синдром: влияние адипокинов на L-аргинин-NO-синтаза-NO сигнальный путь. *Acta Biomed Scient* 6(2): 22–40. [Kuznetsova LA (2021) Metabolic Syndrome: The Influence of Adipokines on the L-Arginine-NO Synthase-Nitric Oxide Signaling Pathway. *Acta Biomed Scient* 6(2): 22–40. (In Russ)]. <https://doi.org/10.29413/ABS.2021-6.2.3>
54. 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>
55. Зинчук ВВ, Глуткина НВ (2013) Кислородсвязывающие свойства гемоглобина и монооксида азота. Рос физиол жур 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)]. <http://elib.grsmu.by/handle/files/9743>

Oxygen-Dependent Aspects of the Action of Asprosyn

V. V. Zinchuk^{a, *}, and J. S. O. Al-Jebur^b

^aGrodna state medical University, Grodna, Belarus

^bState University of Grodno Yanka Kupala, Grodno, Belarus

*e-mail: zinchuk@grsmu.by

A new hormone from the group of adipokines, called asprosin, was discovered in adipose tissue, which is a regulator of the body's reactions to short-term fasting, initiates the release of glucose from the liver and increases appetite, and increases the total amount of energy reserves in adipose tissue. This hormone, determining the bioenergetic status of the body, affects the oxygen content in tissues, and, accordingly, the oxygen transport function of the blood in case of excess body weight and insulin resistance. In persons with an increased content of asprosin with overweight and obesity of the first degree, as well as with insulin resistance, a change in the position of the oxyhemoglobin dissociation curve is observed, accompanied by an increase in the concentration of the gas transmitter nitrogen monoxide and a decrease in the level of hydrogen sulfide. This factor is involved in the regulation of the gas transmitter system and the formation of blood oxygen transport mechanisms. The contribution of asprosin to the formation of oxygen supply and adaptive reserves of the body in individuals with metabolic disorders, which reflects a new aspect of the mechanism of its action.

Keywords: asprosin, fatty tissue, excess weight, blood, oxygen, gas transmitter

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИНСУЛИНОВЫЙ СИГНАЛИНГ В НЕЙРОНАХ ТУБЕРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ

© 2024 г. П. А. Анфимова¹, В. В. Порсева¹, Л. Г. Панкратова¹, Е. С. Ширина,
П. М. Маслюков^{1,*}

¹Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия

* E-mail: mpm@ysmu.ru

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята к публикации 29.01.2024 г.

Гипоталамус является регуляторным центром, контролирующим гомеостаз, репродукцию, циркадные ритмы и эндокринную систему. Он также участвует в регуляции старения. Распределение и количество белка инсулинового рецептора (INR), а также инсулин-рецепторного субстрата-1 (IRS1) определялись в нейронах аркуатного (ARN), дорсомедиального (DMN) и вентромедиального (VMN) ядер гипоталамуса крысы при помощи иммуногистохимического метода и вестерн-блоттинга у самцов молодых (2 месяца), взрослых (12 месяцев) и старых (24 месяца) крыс. Результаты показали, что экспрессия INR и IRS1 в нейронах ядер медиобазального гипоталамуса крысы меняется с возрастом разнонаправленно. С возрастом экспрессия INR снижается в ARN и увеличивается в DMN и VMN. Экспрессия IRS1 не меняется в ARN и VMN и снижается в DMN по мере старения. Таким образом, при старении наблюдаются разнонаправленные изменения экспрессии компонентов инсулинового сигналинга в нейронах туберальных ядер гипоталамуса, которые являются проявлением более общего процесса увеличения гетерогенности в стареющих органах и тканях, что приводит к регуляторным нарушениям и развитию возраст-зависимых заболеваний.

Ключевые слова: инсулиновый сигналинг, иммуногистохимия, гипоталамус, старение

DOI: 10.31857/S0869813924040041, **EDN:** COCMSP

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что инсулин является ключевым регулятором энергетического гомеостаза, воздействуя на периферические ткани и головной мозг. Нейрональный инсулиновый сигналинг не только играет ключевую роль в регуляции метаболизма, но также в регуляции поведения и когнитивных функций. Нарушение регуляции передачи сигналов инсулина также связано с рядом заболеваний головного мозга, включая психические и нейродегенеративные [1, 2].

Передача сигналов инсулина может осуществляться по двум различным сигнальным путям: а) фосфоинозитид-3-киназа (PI3K)/протеинкиназа В (АКТ)/мишень рапамицина у млекопитающих (mTOR) и б) каскад митоген-активируемых протеинкиназ, включая его эффекторный компонент – ERK1/2 (киназу, активируемую внеклеточными

сигналами). Путь PI3K/AKT в основном регулирует метаболизм, тогда как MAPK/ERK контролирует рост и пролиферацию клеток [1–3].

INR обладает внутренней тирозинкиназной активностью, а стимуляция инсулином индуцирует его аутофосфорилирование и цепочку реакций, опосредованных белками-субстратами инсулинового рецептора (IRS) 1 и 2. В свою очередь, IRS1 и IRS2 активируют PI3K, которая продуцирует фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3) из мембранного фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата. PIP3 обеспечивает закрепление фосфоинозитол-зависимой протеинкиназы (PDK-1/2) в мембране, которая катализирует фосфорилирование и активацию AKT. При активации AKT выходит из мембраны и далее фосфорилирует многочисленные субстраты в цитоплазме и ядре, что играет ключевую роль в регуляции многочисленных процессов, включая регуляцию клеточного цикла, метаболизма, апоптоза и передачи сигнала [1–3].

В пути MAPK/ERK активированные INR и IRS связывают адаптерные молекулы Grb2 и Shc, которые содержат домены SH2. Фосфорилирование Shc и Grb2 посредством фактора обмена гуаниновых нуклеотидов son of Sevenless (SOS) дополнительно активирует небольшой G-белок Ras. После активации GTP-связанная форма (Ras-GTP) стимулирует нижележащие эффекторы Raf, которые стимулируют его нижележащую мишень MEK, впоследствии MEK фосфорилирует MAP-киназы ERK1 и 2. Активированная ERK1/2 может фосфорилировать субстраты в цитозоле и факторы транскрипции в ядре, регулируя экспрессию генов, участвует в клеточном делении, миграции, дифференцировке и апоптозе [4].

INR, IRS1 и IRS2 были выявлены в различных областях мозга, включая гипоталамус [5]. В мозге инсулин играет важную роль в формировании нейронных сетей во время развития, модулирует синаптическую пластичность и поддерживает выживаемость нейронов, ингибируя апоптоз [1, 5]. Снижение передачи сигналов инсулина продлевает продолжительность жизни у различных видов [6–9]. Предположительно, инсулин и инсулиноподобный фактор роста (IGF1) могут влиять на старение через сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR [6, 7, 10]. Было выявлено, что с возрастом активность mTOR возрастает. Умеренное подавление активности mTOR рапамицином у старых мышей приводило к активации процессов аутофагии, активации иммунной системы, в том числе противоопухолевого звена [11].

В ряде работ получены данные о том, что активация INR в физиологических концентрациях в головном мозге преимущественно стимулирует IRS1, а стимуляция рецепторов к IGF1 вызывает активацию IRS2 [12–14]. При этом центральная инсулинорезистентность сопровождалась снижением активации IRS1, в то время как при резистентности к IGF1 в головном мозге отмечалось ослабление стимуляции IRS2 [13]. Также было установлено, что нокдаун или сверхэкспрессия IRS1 не влияли на IGF сигналинг, в отличие от нокдауна IRS-2, при котором IGF1 сигналинг нарушался [14].

Гипоталамус является основным регулятором гомеостаза, биологических ритмов и адаптации к различным факторам внешней среды. Медиобазальные ядра гипоталамуса, в том числе аркуатное (ARN), дорсомедиальное (DMN) и вентромедиальное (VMN), принимают участие не только в регуляции обмена веществ и энергетического баланса, но и в контроле старения [10, 15–16]. В наших предыдущих работах мы выявили, что экспрессия компонентов инсулинового сигналинга, включая PI3K, AKT и mTOR, менялась в медиобазальных ядрах гипоталамуса у крыс в различные возрастные периоды [17, 18]. Однако данные об изменениях экспрессии INR и IRS1 в гипоталамусе в процессе старения отсутствуют.

Целью настоящего исследования было определение экспрессии INR и IRS1, расположения и процентного содержания INR- и IRS1-иммунореактивных (ИР) нейронов в туберальной группе ядер гипоталамуса (ARN, DMN и VMN) у крыс в процессе старения, включая молодых, взрослых и старых животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа выполнена на самцах ($n = 30$) линии Вистар в возрасте 2 ($n = 10$), 12 ($n = 10$) и 24 месяца ($n = 10$) после рождения. Все животные содержались в акриловых клетках с древесной стружкой в акклиматизированном помещении (12/12-часовой цикл света/темноты; 22 ± 3 °C) при доступе к пище и воде *ad libitum*. После введения летальной дозы уретана (3 г/кг, внутривенно) животных перфузировали транскардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS; 0.01 M Na_2HPO_4 , 0.0027 M KCl, 0.137 M NaCl, pH 7.4) (Биолот, Россия).

Иммуногистохимия. Далее крыс перфузировали 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США). После перфузии головной мозг извлекали и иссекали участок гипоталамуса в области срединного возвышения согласно координатам атласа мозга крыс [19]. Серии коронарных срезов гипоталамуса толщиной 14 мкм изготавливали с помощью криотома Shandon E (Thermo Scientific, Великобритания).

С целью выявления нейронов, содержащих INR и IRS1, применялось двойное мечение антителами. Срезы прединкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% ослиной сыворотки (Jackson ImmunoResearch, США), 1% тритона X-100, 0.1% бычьего сывороточного альбумина, 0.05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными кроличьими антителами (AbClonal, Китай) против INR (A19067) и IRS1 (A0245), разведение 1:200 в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали со вторичными антителами в течение 2 ч. Вторичные антитела были конъюгированы с флуорохромом индокарбоцианином (Cy3), дающим красную флуоресценцию (разведение 1:150, Jackson ImmunoResearch, США). Окраску клеток всей популяции нейронов проводили красителем, флуоресцирующим в зеленой области спектра, – NeuroTrace Green Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США), разведение 1:200. После этого срезы отмывали в PBS и заключали в среду для флуоресцентной микроскопии VectaShield (Vector Laboratories, США). Для исключения неспецифической реакции часть срезов инкубировали без первичных и/или вторичных антител.

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе «Olympus BX43» (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD камерой Tucsен FL-20 с программным обеспечением Mosaic V2.1 (Китай). Для выявления меченых нейронов использовали каждый третий из серийных срезов. Число иммунореактивных (ИР) нейронов определяли на изображениях срезов, полученных под объективом 20x/0.50. Площадь изображений составляла 0.14 мм². Долю ИР нейронов определяли как их отношение к общему количеству нейронов, выявленных NeuroTrace Fluorescent Nissl Stains, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нейроны, срез которых прошел через ядро с видимым ядрышком и с флуоресценцией, превышающей фоновое свечение. Процент ИР нейронов определяли с помощью программы Image J (NIH, США).

Вестерн-блоттинг. На вибратоме изготавливались срезы гипоталамуса толщиной 300 мкм. Под стереомикроскопом на срезах вырезались ВМЯ, которые затем гомогенизировали с буфером для лизиса и денатурировали при 95 °C в течение 5 мин. Белки в пробах разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле и переносили на мембраны PVDF (AppliChem, Германия). Мембраны блокировали раствором, содержащим 3% обезжиренного сухого молока (AppliChem, Германия) в TBS-T (0.1% Tween 20, 0.2 mM Трис, 137 mM NaCl), в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывки TBS-T мембраны инкубировали с первичными кроличьими антителами против INR (A19067) и IRS1 (A0245) (AbClonal, Китай) и мышинными моноклональными против GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, GB15002, Servicebio, Китай), разведение 1:1000 при 4 °C на ночь. После промывки TBS-T мембраны инкубировали со вторичными антителами (козьи HRP-конъюгированные антикроличьи и антимишьяные

IgG (AbClonal, Китай)) в соотношении 1:3000. Иммуноблоты выявлялись путем хемилюминесценции (ECL Prime детектирующий реагент вестерн-блоттинга, BioRad) с использованием геля-документирующей системы Syngene G:BOX Chemi XR5E (Syngene, Великобритания). Количественный анализ хемилюминесцентных сигналов проводился при помощи программного обеспечения Gene Tools Gel Analysis (Syngene, Великобритания), и их оптическая плотность выражалась относительно GAPDH. Маркеры молекулярной массы белков были включены в каждый анализ вестерн-блот.

Статистическая обработка данных проведена с использованием пакетов прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, США). Все величины представлены как среднее арифметическое $\pm$ ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий средних величин определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с коррекцией Бонферрони. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По данным иммуногистохимического метода, во всех исследованных ядрах гипоталамуса, включая ARN, DMN и VMN, INR-ИР и IRS1-ИР нейроны выявлялись в большом числе (рис. 1, 2). В каждом из ядер ИР нейроны были распределены сравнительно равномерно. По данным вестерн-блоттинга, у всех животных в вышеуказанных ядрах выявлялись полосы, соответствующие молекулярной массе белка 110 кДа (INR) и 180 кДа (IRS1) (рис. 3).

Возрастные изменения экспрессии INR. В ARN процент INR-ИР нейронов составил $82 \pm 2\%$ у 2-месячных крыс, $80 \pm 3\%$ у 12-месячных и достоверно снизился до $65 \pm 1\%$ у 24-месячных крыс ($p < 0.01$ по сравнению с 2- и 12-месячными крысами, рис. 1). В DMN и VMN доля INR-ИР нейронов достоверно увеличивалась в возрасте от 2 до 12 месяцев и не менялась в период от 12 до 24 месяцев: в DMN – с $56 \pm 5\%$ у 2-месячных крыс до $67 \pm 1\%$ у 12- и $66 \pm 2\%$ у 24-месячных крыс ($p < 0.05$ в сравнении 24-месячных с 2- и 12-месячными крысами); в VMN – от $59 \pm 2\%$ у 2-месячных крыс до $80 \pm 4\%$ у 12-месячных и $77 \pm 2\%$ у 24-месячных крыс ($p < 0.01$ при сравнении 2-месячных с 12- и 24-месячными крысами).

Экспрессия INR относительно GAPDH достоверно уменьшалась в ARN с 0.56 ± 0.04 у 12-месячных до 0.45 ± 0.03 у 24-месячных крыс ($p < 0.05$) и увеличивалась в возрасте от 2 до 12 месяцев в DMN с 0.65 ± 0.03 до 0.77 ± 0.04 ($p < 0.05$), в VMN – с 0.53 ± 0.03 до 0.66 ± 0.03 ($p < 0.05$) (рис. 3).

IRS1 в постнатальном онтогенезе. В ARN процент IRS1-ИР нейронов составлял $74 \pm 2\%$ у 2-месячных крыс, $73 \pm 3\%$ у 12-месячных и $76 \pm 2\%$ у 24-месячных крыс. В VMN этот же показатель составил $70 \pm 3\%$ у 2-месячных, $69 \pm 5\%$ у 12-месячных и $78 \pm 4\%$ у 24-месячных животных. В ARN и VMN различия между возрастными группами не были статистически значимыми ($p > 0.05$) (рис. 2). Однако в DMN доля IRS1-ИР нейронов составляла у 2-месячных $72 \pm 5\%$ и достоверно снижалась до $56 \pm 4\%$ у 12-месячных крыс ($p < 0.01$ по сравнению с 2-месячными) и далее снижалась до $43 \pm 3\%$ у 24-месячных животных ($p < 0.001$ по сравнению с 2-месячными и $p < 0.05$ по сравнению с 12-месячными крысами).

Экспрессия IRS1 относительно GAPDH достоверно не менялась с течением возраста в ARN и VMN, где варьировала от 0.67 ± 0.04 до 0.75 ± 0.05 , но уменьшалась в DMN с 0.68 ± 0.03 у 12-месячных до 0.52 ± 0.03 у 24-месячных животных ($p < 0.05$) (рис. 3), что подтверждает данные иммуногистохимического исследования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В текущем исследовании мы впервые получили данные об экспрессии INR и IRS1 в нейронах туберальных ядер гипоталамуса во время старения. Мы обнаружили, что

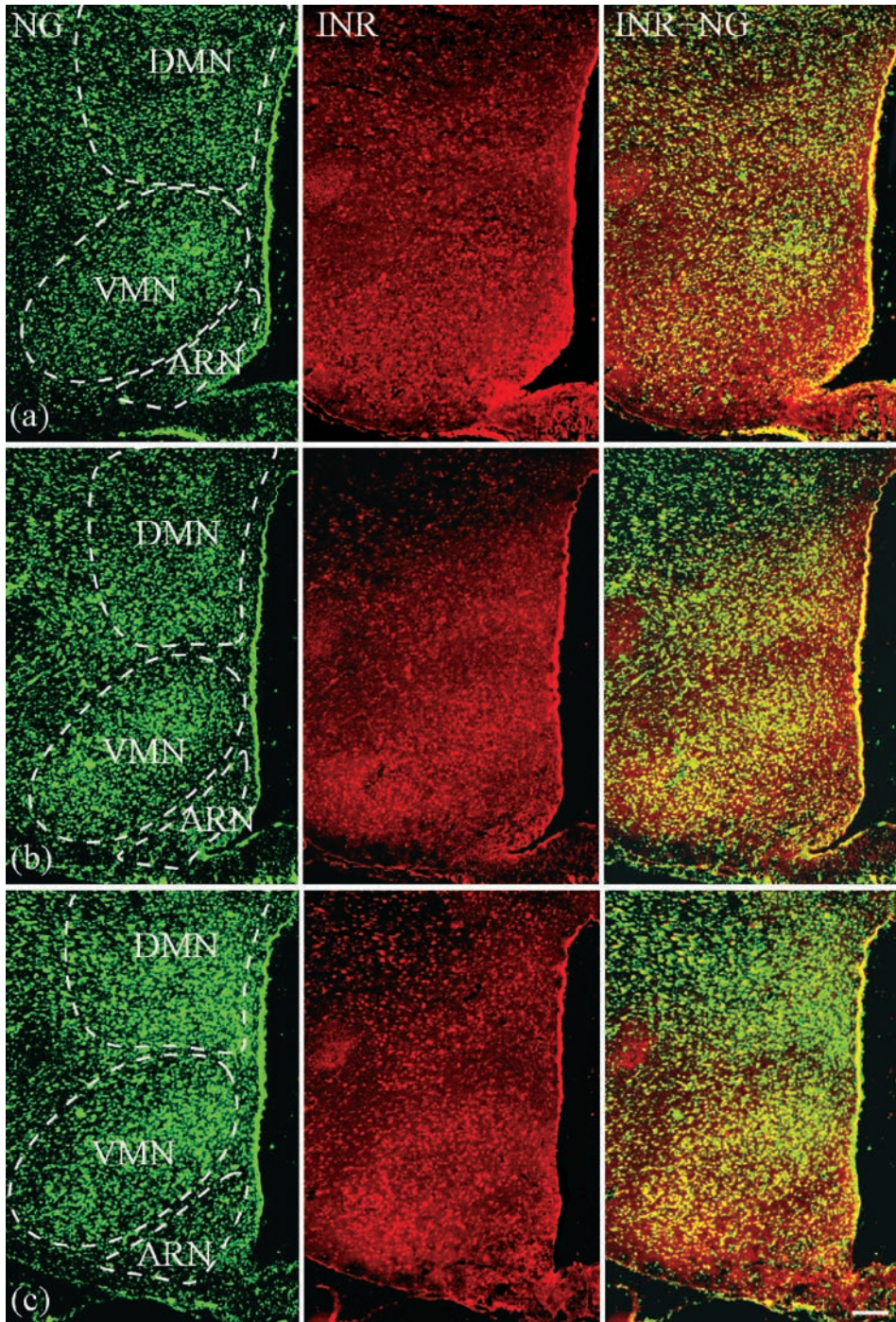


Рис. 1. Микрофотографии с двойным мечением: окраска NeuroTrace Green (NG, зеленый, левый ряд), INR (красный, средний ряд), комбинированное фото INR+NG (правый ряд) нейронов 2- (а), 12- (b) и 24-месячных (с) крыс. ARN – аркуатное, DMN – дорсомедиальное и VMN – вентромедиальное ядро. Флуоресценция Cy3 (красный), NeuroTrace Green (зеленый). Масштаб – 300 мкм.

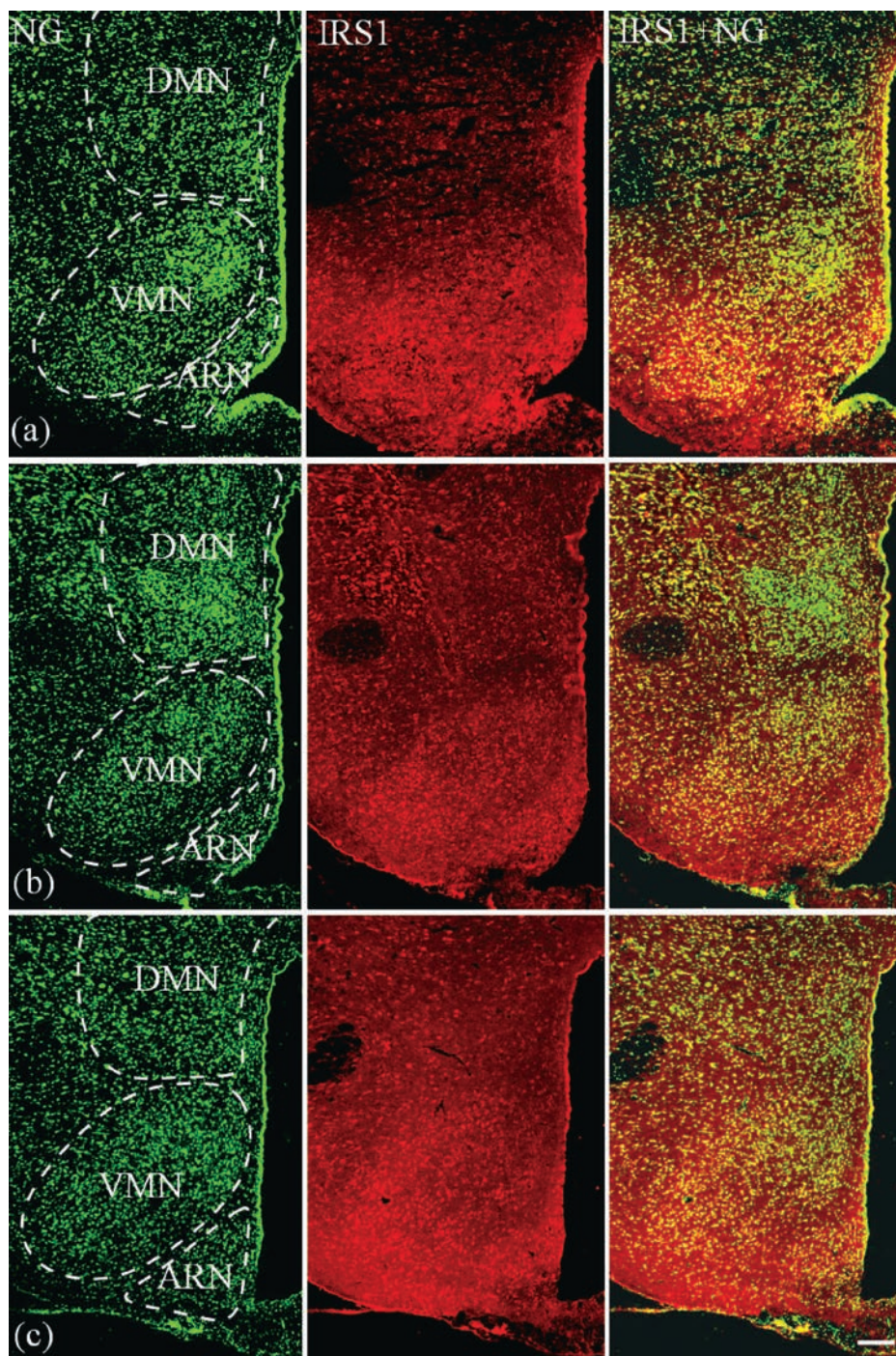
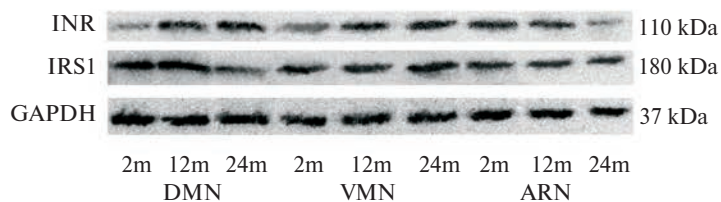
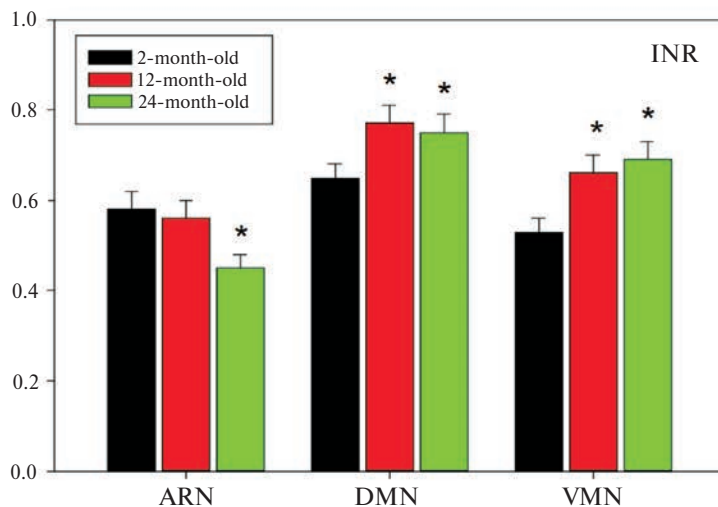


Рис. 2. Микрофотографии с двойным мечением: окраска NeuroTrace Green (NG, зеленый, левый ряд), IRS1 (красный, средний ряд), комбинированное фото IRS1+NG (правый ряд) нейронов 2- (а), 12- (б) и 24-месячных (с) крыс. ARN – аркуатное, DMN – дорсомедиальное и VMN – вентромедиальное ядро. Флуоресценция Су3 (красный), NeuroTrace Green (зеленый). Масштаб – 300 мкм.



(a)



(b)

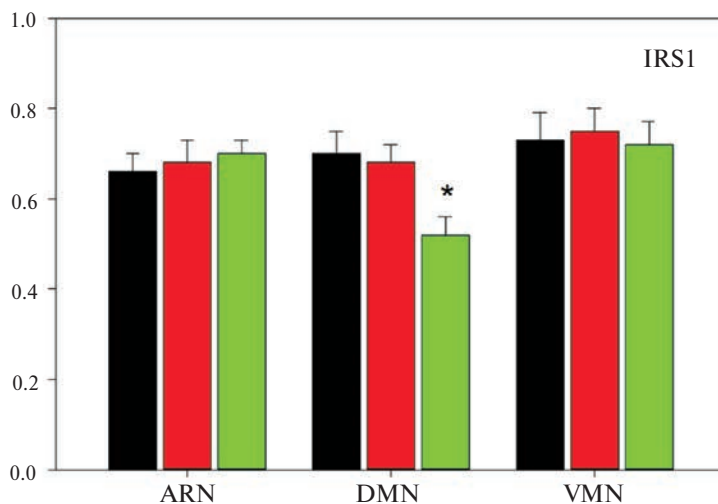


Рис. 3. Вестерн-блоты IRN и IRS1 (а), количественный анализ уровня экспрессии белков IRN (b), IRS1 (с) в дорсомедиальном (DMN), вентромедиальном (VMN) и аркуатном (ARN) ядрах гипоталамуса у 2- (2m), 12- (12m) и 24-месячных (24m) крыс. Данные представлены в процентах от уровня экспрессии GAPDH.

* $p < 0.05$; различия достоверны по сравнению с 2-месячными крысами.

экспрессия INR и IRS1 и процентное содержание INR-ИР и IRS1-ИР нейронов варьирует в отдельных ядрах медиобазального гипоталамуса крысы и с течением возраста изменяется разнонаправленно. С возрастом экспрессия INR и доля INR-ИР нейронов снижается в ARN и увеличивается в DMN и VMN. Однако экспрессия IRS1 и процент IRS1-ИР нейронов не меняется в ARN и VMN и снижается в DMN по мере старения.

У млекопитающих, но не у беспозвоночных, активность пути инсулин/IGF1 регулируется гормоном роста, секретируемым гипофизом. Секреция гормона роста снижается с возрастом [20]. Литературные данные свидетельствуют о том, что ослабление инсулинового сигналинга у старых животных продлевает продолжительность жизни [6–9]. Тем не менее изменения в начальных компонентах инсулинового сигналинга, включая INR и IRS1, могут оказывать неоднозначное влияние на старение млекопитающих.

Глобальное ослабление инсулинового сигналинга за счет нокаута INR приводит к ранней смертности [21, 22]. Полное нарушение передачи сигналов инсулина вызывает метаболический синдром, снижение размеров тела и фертильности [23]. Также инсулин в головном мозге действует как нейропротектор, снижая повреждения, вызванные ишемией, токсичностью β -амилоида, окислительным стрессом и апоптозом [24]. Резистентность мозга к инсулину и низкие уровни инсулина в мозге часто приводят к метаболическим и когнитивным дисфункциям, включая такие возраст-зависимые заболевания, как ожирение, сахарный диабет 2-го типа и болезнь Альцгеймера [25, 26].

Гипоталамическая инсулинорезистентность, связанная с ожирением, возникает быстрее, чем в других инсулинчувствительных тканях [27]. Тем не менее избирательное удаление INR в орексигенных и анорексигенных нейронах ARN оказывает лишь умеренное влияние на энергетический баланс [28, 29]. Кроме того, мышцы, у которых отсутствовал INR в нейронах латерального гипоталамуса, содержащих меланин-концентрирующий гормон, имели худощавый фенотип и демонстрировали улучшенную двигательную активность и чувствительность к инсулину при диете с высоким содержанием жиров [30].

Возрастные заболевания, такие как ожирение, кожные патологии, остеопороз, саркопения и непереносимость глюкозы, реже встречались у мышей с полным нокаутом IRS1 [31]. По сравнению с делецией IRS1 в мышцах, печени и жире, нейрон-селективный нокаут IRS1 увеличивал потребление энергии, двигательную активность и чувствительность к инсулину, особенно у старых самцов мышей, но не увеличивал продолжительность жизни [32]. В то же время при интраназальном введении инсулина в ЦНС генная экспрессия и содержание белка INR в структурах мозга резко снижаются, что связано с необходимостью снизить избыточную активацию инсулином его сигнальных путей в мозге, а при сахарном диабете 1-го типа в условиях системного дефицита инсулина содержание инсулиновых рецепторов в ЦНС возрастает [33]. Также установлено, что при выключении одного из типов IRS возникает компенсаторная активация другого подтипа в коре головного мозга. Фосфорилирование IRS1 по остаткам серина может ингибировать активность IRS1. При этом при инсулинорезистентности чувствительность инсулиновых рецепторов головного мозга и уровни экспрессии IRS1/2 могут снижаться в сочетании с повышенным уровнем фосфорилирования IRS1 [34, 35].

Различия экспрессии INR и IRS1 в различных ядрах туберальной группы гипоталамуса могут быть связаны с их функциональными особенностями. В частности, в ARN отмечается повышенная проницаемость гематоэнцефалического барьера по сравнению с DMN и VMN. При этом глюкоза и жирные кислоты стимулируют путь, связанный с активацией NF- κ B и развитием нейровоспаления в первую очередь в области вышеуказанного ядра, что может объяснять снижение экспрессии INR в ARN по сравнению с DMN и VMN [16]. У мышей с экспериментальным сахарным диабетом экспрессия INR была также снижена в жировой ткани [36]. Процент нейронов, имму-

нопозитивных к мишени рапамицина млекопитающих (mTOR), являющегося одним из звеньев внутриклеточной передачи инсулинового сигнала, снижается в DMN и не изменяется в VMN при старении [18], что соответствует изменениям экспрессии IRS1, выявленным в настоящей работе.

При старении в ядрах гипоталамуса происходит усиление взаимно противоположных процессов торможения и возбуждения, связанных с активацией ГАМК и глутаматергической системы [37], наблюдается дисбаланс нейронального кальциевого сигналинга [38, 39], а также разнонаправленные изменения компонентов внутриклеточного сигналинга, в частности, PI3K/АКТ/mTOR [18]. Данные, полученные методом транскриптомики одиночных клеток, свидетельствуют о возрастании транскрипционной гетерогенности при старении [40].

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что при старении в туберальных ядрах гипоталамуса выявляются разнонаправленные изменения экспрессии начального звена инсулинового сигналинга, включая INR и IRS1, которые являются проявлением более общего процесса увеличения гетерогенности в стареющих органах и тканях, что приводит к регуляторным нарушениям и развитию возраст-зависимых заболеваний.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств РНФ (грант 19-15-00039). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Ярославского государственного медицинского университета Минздрава РФ (протокол № 60 от 16.02.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шпаков АО* (2015) Функциональная активность инсулиновой сигнальной системы мозга в норме и при сахарном диабете 2-го типа. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 101: 1103–1127. [*Shpakov AO* (2015) Functional activity of the brain insulin signaling system in norm and in type 2 diabetes mellitus. *Russ J Physiol* 101: 1103–1127 (In Russ)].
2. *Chen W, Cai W, Hoover B, Kahn CR* (2022) Insulin action in the brain: cell types, circuits, and diseases. *Trends Neurosci* 45(5): 384–400. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.03.001>
3. *Haesler RA, McGraw TE, Accili D* (2018) Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(1): 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
4. *Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF* (2015) Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res* 35: 600–604. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412>

5. *Pomytkin I, Costa-Nunes JP, Kasatkin V, Veniaminova E, Demchenko A, Lyundup A, Lesch KP, Ponomarev ED, Strekalova T* (2018) Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. *CNS Neurosci Ther* 24: 763–774.
<https://doi.org/10.1111/cns.12866>
6. *Anisimov VN, Bartke A* (2013) The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 87: 201–223.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.01.005>
7. *Bartke A, Brown-Borg H* (2021) Mutations Affecting Mammalian Aging: GH and GHR vs IGF-1 and Insulin. *Front Genet* 12: 667355.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.667355>
8. *Tabibzadeh S* (2021) Signaling pathways and effectors of aging. *Front Biosci (Landmark Ed)* 26: 50–96.
<https://doi.org/10.2741/4889>
9. *Lee H, Lee SV* (2022) Recent Progress in Regulation of Aging by Insulin/IGF-1 Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* 45: 763–770.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2022.0097>
10. *Masliukov PM* (2023) Changes of Signaling Pathways in Hypothalamic Neurons with Aging. *Curr Issues Mol Biol* 45: 8289–8308.
<https://doi.org/10.3390/cimb451100523>
11. *Mannick JB, Lamming DW* (2023) Targeting the biology of aging with mTOR inhibitors. *Nat Aging* 3: 642–660.
<https://doi.org/10.1038/s43587-023-00416-y>
12. *Denley A, Carroll JM, Brierley GV, Cosgrove L, Wallace J, Forbes B, Roberts CT Jr* (2007) Differential activation of insulin receptor substrates 1 and 2 by insulin-like growth factor-activated insulin receptors. *Mol Cell Biol* 27: 3569–3577.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01447-06>
13. *Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE* (2012) Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest* 122: 1316–1338.
<https://doi.org/10.1172/JCI59903>
14. *Hakuno F, Takahashi SI* (2018) IGF1 receptor signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 61: T69–T86.
<https://doi.org/10.1530/JME-17-0311>
15. *Masliukov PM, Nozdrachev AD* (2021) Hypothalamic Regulatory Mechanisms of Aging. *J Evol Biochem Phys* 57: 473–491.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021030030>
16. *Cai D, Khor S* (2021) Hypothalamic microinflammation. *Handb Clin Neurol* 181: 311–322.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820683-6.00023-3>
17. *Anfimova PA, Moiseev KY, Porseva VV, Pankrasheva LG, Masliukov PM* (2022) mTOR Expression in Neurons of the Rat Tuberal Hypothalamus in Aging. *J Evol Biochem Phys* 58: 1464–1470.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022050167>
18. *Pankrasheva LG, Anfimova PA, Moiseev KY, Shirina ES, Masliukov PM* (2023) PI3K/Akt/mTOR-immunoreactive neurons in the rat mediobasal hypothalamus during aging. *Neurosci Behav Physiol* 53: 1319–1329.
<https://doi.org/10.1007/s11055-023-01504-7>
19. *Paxinos G, Watson C* (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th Edition. Elsevier Acad Press.
20. *Ashpole NM, Sanders JE, Hodges EL, Yan H, Sonntag WE* (2015) Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging brain. *Exp Gerontol* 68: 76–81.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.10.002>
21. *Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A* (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59–72.
22. *Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, José PA, Taylor SI, Westphal H* (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 12: 106–109.
<https://doi.org/10.1038/ng0196-106>
23. *Rincon M, Muzumdar R, Atzmon G, Barzilai N* (2004) The paradox of the insulin/IGF-1 signaling pathway in longevity. *Mech Ageing Dev* 125(6): 397–403.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.03.006>

24. Agrawal R, Reno CM, Sharma S, Christensen C, Huang Y, Fisher SJ (2021) Insulin action in the brain regulates both central and peripheral functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 321: E156–E163.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00642.2020>
25. Ezkurdia A, Ramirez MJ, Solas M (2023) Metabolic Syndrome as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: A Focus on Insulin Resistance. *Int J Mol Sci* 24: 4354.
<https://doi.org/10.3390/ijms24054354>
26. Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci OA* 1: FSO25.
<https://doi.org/10.4155/fso.15.23>
27. Ono H (2019) Molecular Mechanisms of Hypothalamic Insulin Resistance. *Int J Mol Sci* 20: 1317.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061317>
28. Köner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, Xu C, Enriori P, Hampel B, Barsh GS, Kahn CR, Cowley MA, Ashcroft FM, Brüning JC (2007) Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab* 5: 438–449.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.004>
29. Shin AC, Filatova N, Lindtner C, Chi T, Degann S, Oberlin D, Buettner C (2017) Insulin Receptor Signaling in POMC, but Not AgRP, Neurons Controls Adipose Tissue Insulin Action. *Diabetes* 66: 1560–1571.
<https://doi.org/10.2337/db16-1238>
30. Hausen AC, Ruud J, Jiang H, Hess S, Varbanov H, Kloppenburg P, Brüning JC (2016) Insulin-Dependent Activation of MCH Neurons Impairs Locomotor Activity and Insulin Sensitivity in Obesity. *Cell Rep* 17: 2512–2521.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.030>
31. Selman C, Lingard S, Choudhury AI, Batterham RL, Claret M, Clements M, Ramadani F, Okkenhaug K, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Al-Qassab H, Speakman JR, Carmignac D, Robinson IC, Thornton JM, Gems D, Partridge L, Withers DJ (2008) Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J* 22: 807–818.
<https://doi.org/10.1096/fj.07-9261com>
32. Baghdadi M, Nesipital T, Mesaros A, Buschbaum S, Withers DJ, Grönke S, Partridge L (2023) Reduced insulin signaling in neurons induces sex-specific health benefits. *Sci Adv* 9: eade8137.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.ade8137>
33. Derkach KV, Ivantsov AO, Chistyakova OV, Sukhov IB, Buzanakov DM, Kulikova AA, Shpakov AO (2017) Intranasal Insulin Restores Metabolic Parameters and Insulin Sensitivity in Rats with Metabolic Syndrome. *Bull Exp Biol Med* 163: 184–189.
<https://doi.org/10.1007/s10517-017-3762-6>
34. Ochiai T, Sano T, Nagayama T, Kubota N, Kadowaki T, Wakabayashi T, Iwatsubo T (2021) Differential involvement of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in brain insulin signaling is associated with the effects on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 159: 105510.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105510>
35. Kleinridders A (2016) Deciphering Brain Insulin Receptor and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Signalling. *J Neuroendocrinol* 28: 10.1111.
<https://doi.org/10.1111/jne.12433>
36. Moruzzi N, Lazzeri-Barcelo F, Valladolide-Acebes I, Moede T, Paschen M, Leibiger B, Berggren PO, Leibiger IB (2021) Tissue-specific expression of insulin receptor isoforms in obesity/type 2 diabetes mouse models. *J Cell Mol Med* 25: 4800–4813.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.16452>
37. Anfimova PA, Pankrasheva LG, Emanuilov AI, Moiseev KY, Maslyukov PM (2024) Expression of GAD65/67 and VGLUT2 in Medial Basal Nuclei of Rat Hypothalamus during Aging. *Bull Exp Biol Med* 176: 232–234.
<https://doi.org/10.1007/s10517-024-06001-6>
38. Vishnyakova PA, Moiseev KY, Spirichev AA, Emanuilov AI, Nozdachev AD, Maslyukov PM (2021) Expression of calbindin and calretinin in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei during aging. *Anat Rec (Hoboken)*. 304: 1094–1104.
<https://doi.org/10.1002/ar.24536>
39. Kumar A (2020) Calcium Signaling During Brain Aging and Its Influence on the Hippocampal Synaptic Plasticity. *Adv Exp Med Biol* 1131: 985–1012.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_39
40. Uyar B, Palmer D, Kowald A, Murua Escobar H, Barrantes I, Möller S, Akalin A, Fuellen G (2020) Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence. *Ageing Res Rev* 64: 101156.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101156>

Insulin Signaling in Neurons of the Tuberal Area of the Hypothalamus of Rats During Aging

**P. A. Anfimova^a, V. V. Porseva^a, L. G. Pankrasheva^a, E. S. Shirina^a,
and P. M. Masliukov^{a,*}**

^aYaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

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

The hypothalamus is a regulatory center that controls homeostasis, reproduction, circadian rhythms and the endocrine system. It is also involved in the regulation of aging. The expression of insulin receptors (INR) as well as insulin receptor substrate 1 (IRS-1) was studied in neurons of the arcuate (ARN), dorsomedial (DMN) and ventromedial (VMN) nuclei of the rat hypothalamus using immunohistochemistry and Western blotting in young males (2 months), adult (12 months) and old (24 months) rats. The results showed that the expression of INR and IRS1 in neurons of the nuclei of the mediobasal hypothalamus of rats changes in different directions with age. With age, INR expression decreases in the ARN and increases in the DMN and VMN. IRS1 expression is unchanged in the ARN and VMN and decreases in the DMN with aging.

Keywords: Insulin signaling, immunohistochemistry, hypothalamus, aging

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ЭСТРАДИОЛА НА УГЛЕВОДНО-ЖИРОВОЙ ОБМЕН
И АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ FGF21 У САМОК МЫШЕЙ C57BL/6
ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ СОДЕРЖАНИИ НА ДИЕТЕ КАФЕТЕРИЯ**

© 2024 г. Т. В. Яковлева¹*, А. Ю. Казанцева¹, К. Ю. Мамонтова^{1,2}, Н. М. Бажан^{1,2}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*E-mail: tatyana.jakovleva@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.11.2023 г.

После доработки 22.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Диета кафетерия провоцирует развитие ожирения и метаболического синдрома, снижает чувствительность к инсулину и толерантность к глюкозе. Фактор роста фибробластов 21 (FGF21), гормон печени, способствует адаптации к потреблению сладкой и жирной пищи. Самки мышей менее чувствительны к повреждающему действию диеты кафетерия, чем самцы, что может быть связано с влиянием эстрадиола на активность системы FGF21: на экспрессию гена *Fgf21* в печени, на уровень гормона в крови или на уровень рецепторов и корецепторов бета-клото, которые определяют чувствительность тканей к FGF21. Проверка этого предположения явилась целью данной работы. Влияние эстрадиола (10 мкг/животное раз в три дня) оценивали у овариэктомированных самок мышей C57BL/6, потреблявших диету кафетерия (стандартный корм, сало и печень) в течение двух недель. Определяли показатели углеводно-жирового обмена, вкусовые предпочтения и активность системы FGF21. Овариэктомия повышала массу тела и подкожного жира, потребление сала, экспрессию гена *Pomc* в гипоталамусе, снижала экспрессию рецепторов эстрадиола в печени и потребление печени. Эстрадиол существенного влияния на данные показатели не оказывал. У овариэктомированных самок с недостаточностью эстрадиола уровень в крови холестерина и экспрессия в печени гена глюкоза-6-фосфатазы были ниже, чем у ложнопериовариэктомированных самок, и эстрадиол нормализовал данные показатели. Овариэктомия понижала, а введение эстрадиола повышало уровень мРНК корецептора бета-клото (*Klb*) в печени и в гипоталамусе. Эти результаты предполагают, что на начальных этапах потребления сладкой и жирной пищи эстрадиол повышает чувствительность печени и гипоталамуса к FGF21 и усиливает тем самым вклад системы FGF21 в процессы адаптации к диете кафетерия.

Ключевые слова: диета кафетерия, овариэктомия, эстрадиол, FGF21, вкусовые предпочтения, корецептор бета-клото

DOI: 10.31857/S0869813924040054, **EDN:** CNRTPT

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время доступность и привлекательность сладкой и жирной пищи существенно увеличила долю этих продуктов в рационе человека. Диета с повышенным содержанием жиров и быстрых углеводов (диета кафетерия) при продол-

жительном воздействии провоцирует развитие ожирения, которое не только снижает качество жизни людей, но и является причиной тяжелых метаболических нарушений: способствует развитию стеатоза печени, инсулиновой резистентности, системных воспалительных процессов, сахарного диабета 2-го типа и артериальной гипертензии [1]. Диета кафетерия влияет на метаболические показатели у животных обоих полов: у самцов и самок повышаются масса тела и белого жира, уровни глюкозы, инсулина и холестерина в крови [2]. Однако особи женского пола более устойчивы к повреждающему действию высококалорийных диет. У самок мышей, в отличие от самцов, менее выражены увеличение массы тела, инсулиновая резистентность, гипергликемия и нарушение липидного профиля крови [3]. При длительном потреблении диеты кафетерия у самок мышей в печени снижается экспрессия генов глюконеогенеза, гликолиза и синтеза жирных кислот, а у самцов экспрессия этих генов повышается, и только у самцов развивается гипергликемия [4]. У людей с ожирением сахарный диабет 2-го типа у женщин развивается реже, чем у мужчин [5]. Реакция на потребление высококалорийной пищи различается у самцов и самок уже на ранних этапах изменения типа питания: после кратковременного (не более двух недель) потребления высококалорийной пищи у самцов увеличивается масса тела и жировой ткани, повышаются уровни в крови глюкозы и инсулина, снижаются толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину, тогда как у самок данные показатели не изменяются [6, 7]. Более того, на начальных этапах адаптации к диете с высоким содержанием жиров у самок повышается расход энергии в результате увеличения двигательной активности в светлое время суток [7].

Регулятором адаптации к метаболическим стрессам, в том числе к высококалорийным диетам, которые провоцируют развитие ожирения, называют гормон печени – фактор роста фибробластов 21 (FGF21). В отличие от других факторов роста FGF21 не имеет гепаран-связывающего домена, не оказывает влияния на рост и дифференцировку клеток, может секретироваться в кровотоки и действовать как гормон или в окологлобальное пространство и действовать ауто- или паракринно. Белок FGF21 экспрессируется в печени [8], в жировой ткани [9, 10], в поджелудочной железе [11], в желудочно-кишечном тракте и в скелетных мышцах [12, 13]. FGF21, синтезируемый в печени, секретируется в кровь и действует как гормон [14]. Свое действие FGF21 оказывает через рецепторы факторов роста фибробластов, расположенные на мембране клеток – Fibroblast growth factor receptor (FGFR1c, FGFR2c, FGFR3c), причем аффинность связывания с FGFR1 существенно выше, чем с другими типами рецепторов. FGF21 активирует рецепторы только в том случае, если они находятся в комплексе с трансмембранным белком корецептором бета-клото (KLB) [15, 16]. Таким образом, только ткани, в которых экспрессируется KLB, являются мишенями действия FGF21, и чувствительность ткани к FGF21 зависит от уровня экспрессии рецепторов и корецепторов. Комплексы KLB-FGFR1 обнаружены в буром, белом жире и некоторых отделах ЦНС, включая гипоталамус и задний мозг [10, 17, 18]. В печени KLB тоже экспрессируется, однако экспрессия FGFR1 в печени очень низкая, поэтому основным является комплекс KLB-FGFR4, и в физиологических концентрациях прямое действие FGF21 в печени маловероятно [19]. Тем не менее фармакологическое введение FGF21 подавляет продукцию глюкозы печенью, и это его действие, как предполагают, обусловлено центральными эффектами FGF21 [20].

У животных без ожирения уровень FGF21 в крови очень низкий, потребление сладкой и жирной пищи активирует его экспрессию в печени и в десятки раз повышает его уровень в крови [4]. При фармакологическом введении FGF21 снижает массу тела, уровни глюкозы и триглицеридов в крови, повышает чувствительность к инсулину, модулирует метаболизм глюкозы в печени, повышает потребление белка и подавляет

потребление сладкого и алкоголя у мышей [14, 21–23]. Показано, что у мышей уровни мРНК и белка FGF21 в печени, а также уровни циркулирующего FGF21 претерпевают циклические изменения в течение эстрального цикла, причем самый высокий уровень FGF21 наблюдается в проэструсе, тогда же, когда максимален и уровень циркулирующего эстрадиола (E2) [24]. Более того, экзогенный E2, действуя через рецепторы эстрадиола первого типа, увеличивает экспрессию и продукцию FGF21 в печени [24, 25]. Влияние эстрадиола на активность системы FGF21 показано у мышей при содержании на стандартном корме, тогда как влияние эстрадиола на активность системы FGF21 в условиях метаболического стресса не изучали. Известно только, что у мышей с ожирением экзогенный эстрадиол влияет на фармакологические эффекты FGF21 [26]. Можно предположить, что большая устойчивость самок к повреждающему действию диеты обусловлена стимулирующим влиянием эстрадиола на систему FGF21. Проверка этого предположения явилась целью данной работы. Об активации системы FGF21 может свидетельствовать повышение уровня FGF21 в крови, а также повышение уровня мРНК *Fgf21* в печени и мРНК *Klb* в тканях-мишенях. Мы исследовали влияние эстрадиола на активность системы FGF21, а также на массу тела, печени и жировых депо, биохимические показатели крови, вкусовые предпочтения, экспрессию генов белков, участвующих в регуляции потребления пищи, в гипоталамусе и экспрессию генов, влияющих на чувствительность к инсулину и метаболизм глюкозы, в печени у самок мышей C57BL/6 при краткосрочном потреблении пищи с высоким содержанием жиров и быстрых углеводов (диета кафетерия) в модели экспериментального подавления функции яичников (оваризектомия) и последующего введения гормона (эстрадиола).

Понимание механизмов адаптации к потреблению высококалорийной пищи может способствовать выявлению и оценке индивидуальных факторов риска развития метаболических заболеваний.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Эксперимент был выполнен на самках мышей линии C57BL/6J, которых содержали в условиях вивария конвенциональных животных Института цитологии и генетики СО РАН при постоянном световом режиме (12 ч : 12 ч, световая фаза – с 7:30 до 19:30), температуре 22–24 °C и свободном доступе к пище и воде.

Схема эксперимента. В возрасте 15 недель все самки были прооперированы (ложная операция либо оваризектомия) и рассажены в клетки по одной особи. Через две недели после операции животным начинали давать эстрадиол, растворенный в масле, или только масло (растительное масло промышленного производства). Были сформированы три экспериментальные группы: (i) ложнооперированные (ЛО, $n = 6$), которые получали масло, (ii) оваризектомизированные (ОЭ, $n = 7$), получавшие масло, и (iii) оваризектомизированные, которые получали эстрадиол в масле (ОЭ+E2, $n = 8$). Эстрадиол (E2, Sigma, США) давали перорально в 16.00 – 16.30, один раз в три дня, в дозе 10 мкг/животное в объеме 100 мкл. Эффективность выбранной дозы эстрадиола была подтверждена изменением массы матки (74.3 ± 9.6 мг – ЛО; 12.3 ± 0.9 мг – ОЭ; 41.0 ± 2.3 мг – ОЭ+E2). Самок всех экспериментальных групп через 5 дней после начала введения эстрадиола переводили со стандартного корма на диету кафетерия: помимо гранулированного корма (BioPro, Новосибирск, Россия), животные получали также свиное сало (подкожный жир) и сладкое печенье (Шоколадная страна, Бердск, Россия). Массу тела и количество потребленных компонентов пищи в граммах измеряли один раз в три дня. Через две недели диеты, через сутки после последней инъекции E2 эксперимент завершали, животных декапитировали (16.00 – 18.00), измеряли массу печени и жировой ткани различной локализации. Были взяты образцы крови для определения уровня гормонов и метаболитов, образцы печени и гипоталамуса

для оценки уровня экспрессии генов. Взятые образцы тканей немедленно помещали в жидкий азот и хранили при температуре -80°C до выделения РНК. Образцы крови для определения концентрации гормонов и метаболитов центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин ($\text{RCF} = 1306\text{ g}$), полученную плазму хранили при -20°C до проведения биохимического анализа.

Энергетическая ценность (калорийность) компонентов диеты составляла: стандартный корм – 2.5 ккал/г, печень – 4.58 ккал/г, сало – 8.0 ккал/г. Количество энергии (ккал), потребленной с данным компонентом за время эксперимента, рассчитывали по формуле «количество съеденного за время эксперимента компонента диеты (г) $\times$ калорийность компонента (ккал/г)». Среднее суточное потребление энергии с данным компонентом диеты рассчитывали как количество калорий, потребленных с данным компонентом за время эксперимента/количество дней эксперимента. Среднее суточное потребление энергии рассчитывали как суммарное количество энергии (ккал), потребленной со всеми компонентами диеты/количество дней эксперимента.

Образцы печени для определения гликогена гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин ($\text{RCF} = 13793\text{ g}$), супернатант хранили при -80°C до начала анализа. На каждый миллиграмм образца ткани печени брали 20 мкл буфера для гомогенизации. Образцы печени для оценки содержания в ней триглицеридов гомогенизировали в ФСБ (400 мкл буфера на 50 мг ткани) и центрифугировали дважды по 10 минут при 1000 об/мин ($\text{RCF} = 82\text{ g}$), полученный после второго центрифугирования супернатант хранили при температуре -20°C до определения.

Биохимические показатели плазмы крови. Концентрации инсулина, лептина, FGF21, кортикостерона, эстрадиола в плазме крови были измерены с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа Rat/Mouse Insulin ELISA Kit и Mouse Leptin ELISA Kit (EMD Millipore, St. Louis, MI, США), Mouse/Rat FGF-21 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, США), Кортикостерон-ИФА (ООО Хема-Медика, Москва, Россия), Эстрадиол-ИФА (ООО Хема-Медика, Москва, Россия) соответственно. Концентрации глюкозы, общего холестерина, триглицеридов (в крови и в гомогенатах печени) были измерены с помощью коммерческих наборов для флуориметрического анализа Глюкоза-Ново, Холестерин-Ново, Триглицериды-Ново (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) соответственно.

Содержание гликогена в печени. Содержание гликогена в печени определяли ферментативным колориметрическим методом путем оценки концентрации глюкозы после гидролиза гликогена с помощью ферментов альфа-амилазы и глюкоамилазы (ферментные препараты АмилоЛюкс А и ГлюкоЛюкс А ООО ПО Сиббиофарм, Бердск, Россия). Содержание глюкозы в образцах измеряли с помощью коммерческого набора Глюкоза-Ново (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) согласно инструкции производителя.

Оценка активности экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Экспрессию генов оценивали по уровню мРНК методом относительной оценки с проведением обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (Relative quantitation real-time PCR). Общую РНК выделяли из образцов тканей с помощью набора ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. кДНК первой цепи синтезировали с использованием обратной транскриптазы вируса лейкоза мыши Молони (MMLV) (Евроген, Москва, Россия) и олиго (dT) в качестве праймера. Для проведения ПЦР в реальном времени использовали праймеры и зонды TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, California, США): fibroblast growth factor 21 (*Fgf21*, Mm00840165_g1), insulin receptor (*Insr*, Mm01211875_m1), insulin receptor substrate 2 (*Irs2*, Mm03038438_m1), glucose-6-phosphatase (*G6pc*, Mm00839363_m1), estrogen receptor 1 (*Esr1*, Mm00433149_m1), signal transducer and activator of transcription 3 (*Stat3*, Mm01219775_m1), corticotropin releasing

hormone (*Crh*, Mm01293920_s1), agouti related neuropeptide (*AgRP*, Mm00475829_g1), proopiomelanocortin (*Pomc*, Mm00435874_m1), leptin receptor (*Lepr*, Mm00440181_m1), klotho beta (*Klb*, Mm00473122_m1), protein-tyrosine phosphatase 1B (*Ptpn1*, Mm00448427_m1), G protein-coupled estrogen receptor 1 (*Gper*, Mm02620446_s1), beta-actin (*Actb*, Mm00607939_s1). В качестве эндогенного контроля использовали β -актин. Амплификацию последовательности и детекцию флуоресценции проводили на системе Real-time PCR Quant Studio 5 (Applied Biosystems, Foster City, California, США) согласно инструкции производителя. Относительную количественную оценку уровня мРНК данного гена в пробе производили методом $\Delta\Delta CT$.

Статистическая обработка полученных результатов. Для статистической обработки полученных данных использовали программный пакет STATISTICA 10.0 (StatSoft Россия, Москва, Россия). Результаты представлены в виде: среднее арифметическое $\pm$ стандартная ошибка среднего. Для оценки межгрупповых различий проводили попарные сравнения групповых средних с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для анализа влияния овариэктомии и эстрадиола на изменение массы тела во время эксперимента использовали repeated measures ANOVA с факторами: “ЛО”, “ОЭ” и “день диеты”; “ЛО”, “ОЭ+E2” и “день диеты” или «ОЭ», «ОЭ+E2» и «день диеты». Во всех случаях различия считали достоверными при $p < 0.05$. Для оценки взаимосвязи между исследованными показателями проводили корреляционный анализ с применением коэффициента корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Весовые показатели и потребление пищи

У самок всех экспериментальных групп, независимо от эстрогенного статуса, суточное потребление энергии было одинаковым как при содержании на стандартном корме, так и при содержании на диете (стандартный корм + сало + печенье) (рис. 1а). Однако овариэктомированные самки, получавшие только масло без эстрадиола (ОЭ), отличались от ложнооперированных (ЛО) самок по вкусовым предпочтениям: доля калорий, которую самки потребили со стандартным кормом за эксперимент (две недели диеты кафетерия), была одинаковой у самок всех экспериментальных групп, но доля калорий, которую ОЭ самки потребили с салом, была выше ($p < 0.05$), а доля калорий, которую ОЭ самки потребили с печеньем, была ниже ($p < 0.05$), чем данные показатели у ЛО самок (рис. 1б). Экзогенный эстрадиол не влиял на вкусовые предпочтения овариэктомированных самок: доля калорий, которую ОЭ самки, получавшие эстрадиол (ОЭ+E2), потребляли с печеньем и салом, не отличалась от данных показателей у ОЭ самок.

Масса тела во время эксперимента и прирост массы тела за время содержания на диете кафетерия у ОЭ самок был больше, чем у ЛО самок независимо от того, получали самки эстрадиол или растворитель ($p < 0.05$) (рис. 2а, б).

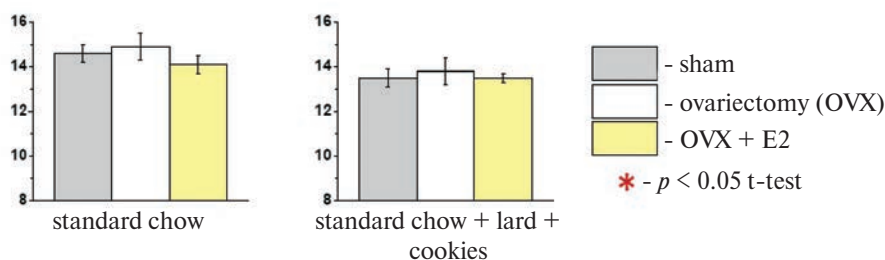
Овариэктомия не повлияла на массу печени, белого висцерального и бурого жира (рис. 3б, с, е). В то же время в конце эксперимента ОЭ самки (ОЭ и ОЭ+E2) отличались от ЛО самок большей массой тела ($p < 0.05$ – ОЭ+E2 самки по сравнению с ЛО самками) и подкожного белого жира ($p < 0.05$ – ОЭ самки и ОЭ+E2 самки по сравнению с ЛО самками) (рис. 3а, д), причем экзогенный эстрадиол не нормализовал данные показатели.

Биохимические показатели крови

Содержание триглицеридов и гликогена в печени

У самок всех экспериментальных групп, независимо от эстрогенного статуса, уровни в крови лептина, триглицеридов и инсулина, а также содержание триглицери-

(a) Energy consumption, kcal/day



(b) The share of energy consumed with the component per experiment, %

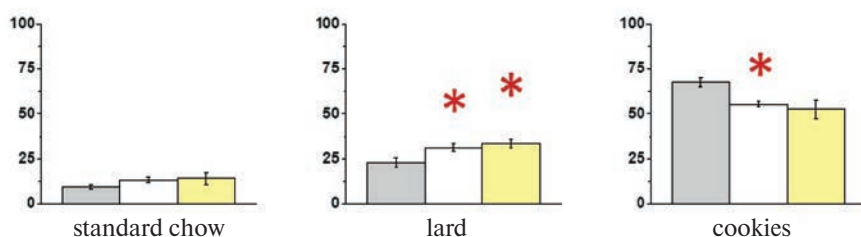


Рис. 1. Среднесуточное потребление энергии при содержании на стандартном корме и диете кафетерия (a) и доля энергии, потребленной с каждым компонентом диеты за время эксперимента, (b) у самок мышей линии C57Bl/6J. Самки были ложно оперированы или овариэктомированы, потребляли стандартный корм, сало и печенье (диета кафетерия), получали перорально раз в три дня в 16.00 – 16.30 эстрадиол (OVX+E2) в дозе 10 мкг/животное или только растворитель (sham и OVX). Эстрадиол начинали вводить за неделю до и вводили в течение двух недель содержания на диете кафетерия. * – $p < 0.05$ по сравнению с ложнооперированными самками (sham), t -test.

дов и гликогена в печени были одинаковыми (рис. 4a, c, d, g, i). У ОЭ самок уровень холестерина в крови был достоверно ниже, чем у ЛО самок ($p < 0.05$), тогда как экзогенный эстрадиол его нормализовал: уровень в крови холестерина у ОЭ+E2 самок не отличался от такового у ЛО самок (рис. 4b). Уровень в крови FGF21 у ОЭ самок был более чем в 2 раза выше, чем у ЛО самок, хотя различия не достигали уровня значимости, при этом экзогенный эстрадиол не оказал значимого влияния на уровень FGF21 в крови (рис. 4f). В то же время самки, получавшие эстрадиол (ОЭ+E2), отличались от ЛО самок сниженным уровнем в крови кортикостерона и глюкозы ($p < 0.05$ в обоих случаях) (рис. 4e, h).

Экспрессия генов в гипоталамусе

У самок, которых содержали на диете кафетерия две недели, экспрессия в гипоталамусе генов, участвующих в регуляции потребления пищи, а именно: рецепторов эстрадиола первого типа (*Esr1*), мембранных G-белок-связанных рецепторов эстрадиола (*Gper*), рецепторов лептина (*Lepr*) и инсулина (*Insr*), была одинаковой у животных всех экспериментальных групп (рис. 5a). Экспрессия генов нейропептидов, орексигенного белка родственного агуту (*Agrp*) и анорексигенного кортикотропин-рилизинг гормона (*Crh*) также не различалась у самок всех экспериментальных групп, тогда как экспрессия гена анорексигенного нейропептида проопиомеланокортина (*Pomc*) у овариэктомированных самок была повышена по сравнению с ЛО самками более чем в 2.5

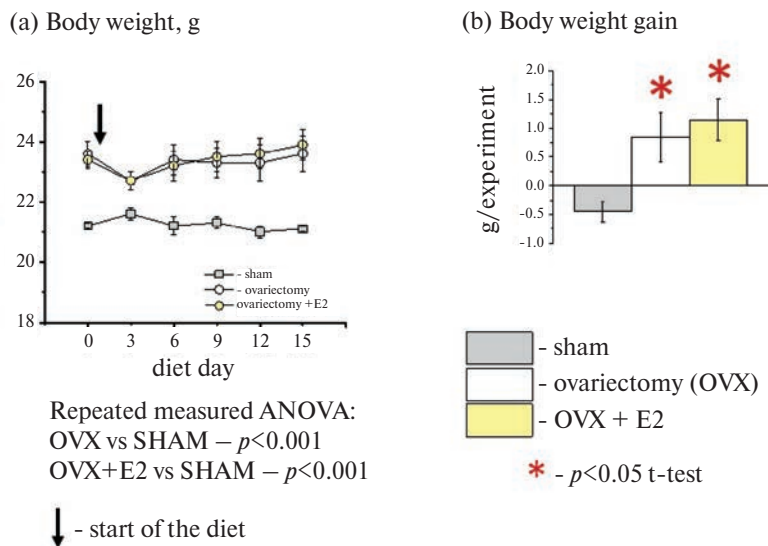


Рис. 2. Динамика массы тела (а) и прирост массы тела (б) за время содержания на диете кафетерия у самок мышей линии C57Bl/6J. Самки были ложно оперированы или овариэктомизированы, потребляли стандартный корм, сало и печень (диета кафетерия), получали перорально один раз в три дня в 16.00 – 16.30 эстрадиол (OVX+E2) в дозе 10 мкг/животное или только растворитель (sham и OVX). Эстрадиол начинали вводить за неделю до и вводили в течение двух недель содержания на диете кафетерия. * – $p < 0.05$ по сравнению с ложнооперированными самками (sham), t -test.

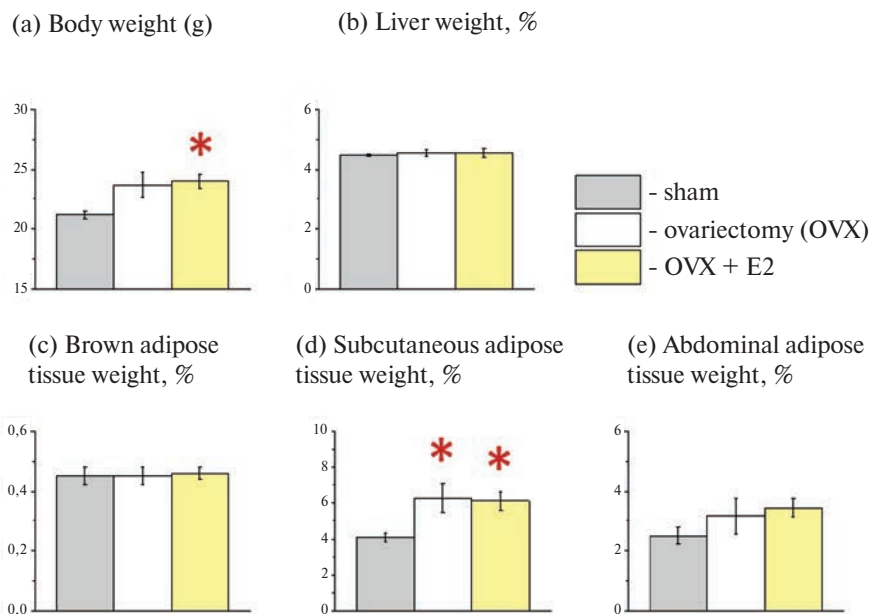


Рис. 3. Масса тела (а), индекс массы печени (б), бурого (с), белого подкожного (д) и висцерального (е) жира у самок мышей линии C57Bl/6J. Самки были ложно оперированы или овариэктомизированы, потребляли стандартный корм, сало и печень (диета кафетерия), получали перорально один раз в три дня в 16.00 – 16.30 эстрадиол (OVX+E2) в дозе 10 мкг/животное или только растворитель (sham и OVX). Эстрадиол начинали вводить за неделю до и вводили в течение двух недель содержания на диете кафетерия. * – $p < 0.05$ по сравнению с ложнооперированными самками (sham), t -test.

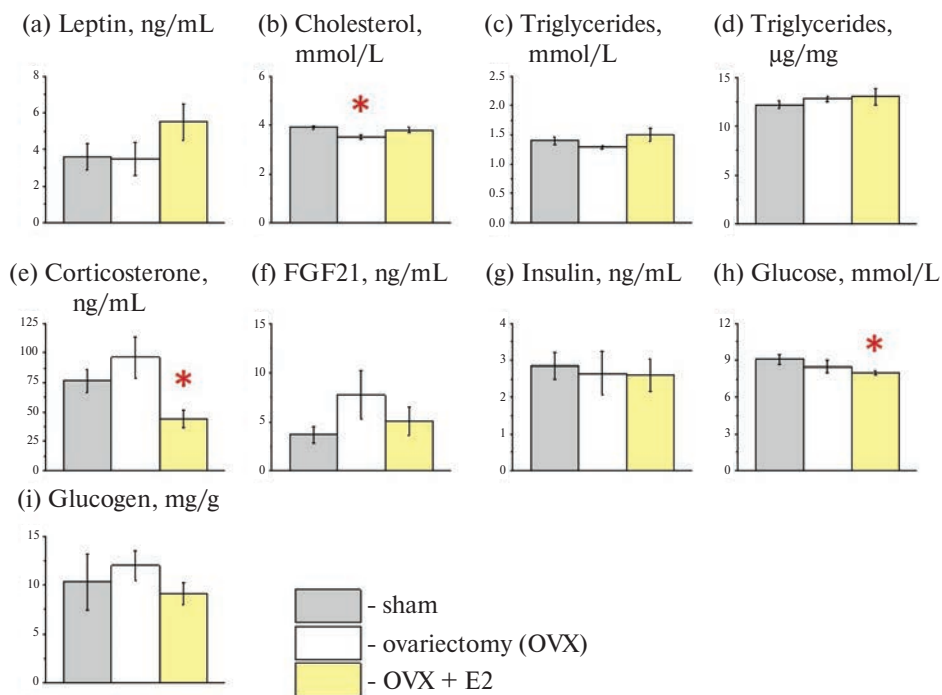


Рис. 4. Уровни в крови лептина (а), холестерина (б), триглицеридов (с), кортикостерона (е), FGF21 (ф), инсулина (г) и глюкозы (h), содержание триглицеридов (d) и гликогена (i) в печени у самок мышей линии C57Bl/6J. Самки были ложно оперированы или овариэктомированы, потребляли стандартный корм, сало и печень (диета кафетерия), получали перорально один раз в три дня в 16.00 – 16.30 эстрадиол (OVX+E2) в дозе 10 мкг/животное или только растворитель (sham и OVX). Эстрадиол начинали вводить за неделю до и вводили в течение двух недель содержания на диете кафетерия. * – $p < 0.05$ по сравнению с ложнооперированными самками (sham), t -test.

раза, причем эстрадиол не влиял на его экспрессию ($p < 0.05$, ОЭ+Е2 самки по сравнению с ЛО самками) (рис. 5b).

Эстрогенный статус самки влиял на систему FGF21 в гипоталамусе, а именно на сигналинг FGF21. У ОЭ самок активность экспрессии гена корцептора бета-клото (*Klb*), белковый продукт которого необходим для проведения сигнала FGF21, была ниже, чем у ложнооперированных: у ОЭ самок уровень мРНК *Klb* был в семь раз ниже, чем у ЛО самок ($p < 0.05$) (рис. 5с). Экзогенный эстрадиол повышал экспрессию *Klb*, и у ОЭ+Е2 самок уровень мРНК *Klb* был в три раза выше, чем у ОЭ самок, получавших масло ($p < 0.05$).

Экспрессия генов в печени

Овариэктомия сопровождалась снижением уровня экспрессии рецепторов эстрадиола в печени: уровень мРНК гена мембранного рецептора эстрадиола (*Gper*) был в три раза ниже, чем у ЛО самок ($p < 0.05$), уровень мРНК гена рецептора эстрадиола первого типа (*Esr1*) был снижен почти в два раза, но изменения не достигали уровня значимости (рис. 6а). Эстрадиол частично восстанавливал экспрессию мембранного рецептора, но не влиял на экспрессию рецептора эстрадиола первого типа: у ОЭ+Е2 самок уровень мРНК *Gper* был выше, чем у ОЭ самок, и не отличался от такового у ЛО самок, уровень мРНК *Esr1* был одинаковым у ОЭ и ОЭ+Е2 са-

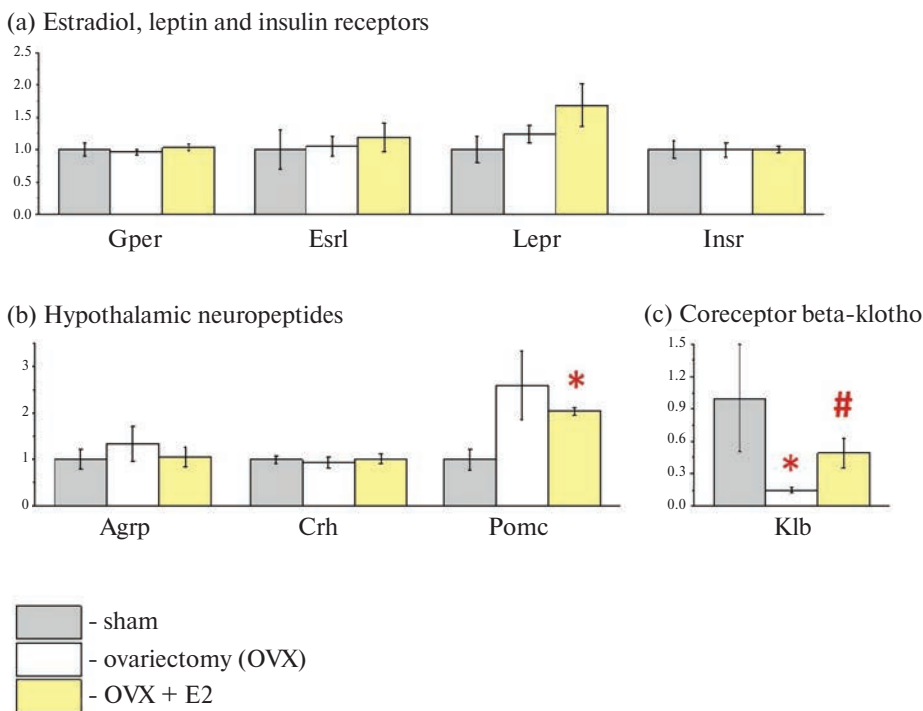


Рис. 5. Уровни мРНК генов рецепторов эстрадиола (*Gper*, *Esr1*), лептина (*Lepr*), инсулина (*Insr*) (a), нейропептидов (*Agrp*, *Crh*, *Pomc*) (b) и корецептора бета-клоото (*Klb*) (c) в гипоталамусе самок мышей линии C57Bl/6J. Самки были ложно оперированы или овариэктомированы, потребляли стандартный корм, сало и печенья (диета кафетерия), получали перорально один раз в три дня в 16.00 – 16.30 эстрадиол (OVX+E2) в дозе 10 мкг/животное или только растворитель (sham и OVX). Эстрадиол начинали вводить за неделю до и вводили в течение двух недель содержания на диете кафетерия. * – $p < 0.05$ по сравнению с ложнооперированными самками (sham), # – $p < 0.05$ по сравнению с овариэктомированными (OVX), *t*-test.

мок. У самок всех экспериментальных групп экспрессия генов, участвующих в передаче и модулировании сигнала инсулина, а именно: рецептора инсулина (*Insr*), субстрата рецептора инсулина 2 (*Irs2*), транскрипционного фактора STAT3 (*Stat3*) и ингибитора рецептора инсулина – протеинфосфотирозинфосфатазы 1B (*Ptpn1*), была одинаковой (рис. 6а, с).

Эстрогенный статус самки влиял на систему FGF21 в печени. У ОЭ самок активность экспрессии гена корецептора бета-клоото (*Klb*), как и в гипоталамусе, была ниже, чем у ЛО самок ($p < 0.05$) (рис. 6б). Экзогенный эстрадиол нормализовал экспрессию *Klb*, и у ОЭ+E2 самок уровень мРНК *Klb* не отличался от такового у ЛО самок. Достоверных различий по уровню экспрессии в печени фактора роста фибробластов 21 (*Fgf21*) между экспериментальными группами не было обнаружено, хотя уровень мРНК *Fgf21* у овариэктомированных самок, независимо от того, получали они эстрадиол или масло, был выше, чем у ЛО самок более чем в 2 раза.

Помимо системы FGF21, эстрогенный статус самки влиял на уровень экспрессии в печени гена глюкоза-6-фосфатазы (*G6pc*): у ОЭ самок уровень мРНК *G6pc* был ниже, чем у ЛО самок (рис. 6с). Экзогенный эстрадиол нормализовал экспрессию *G6pc*, и у ОЭ+E2 самок уровень мРНК *G6pc* не отличался от такового у ЛО самок. Наряду с этим мы обнаружили достоверную отрицательную корреляцию между уровнем мРНК *G6pc* и уровнем FGF21 в плазме крови ($r = -0.55$, $p < 0.05$).

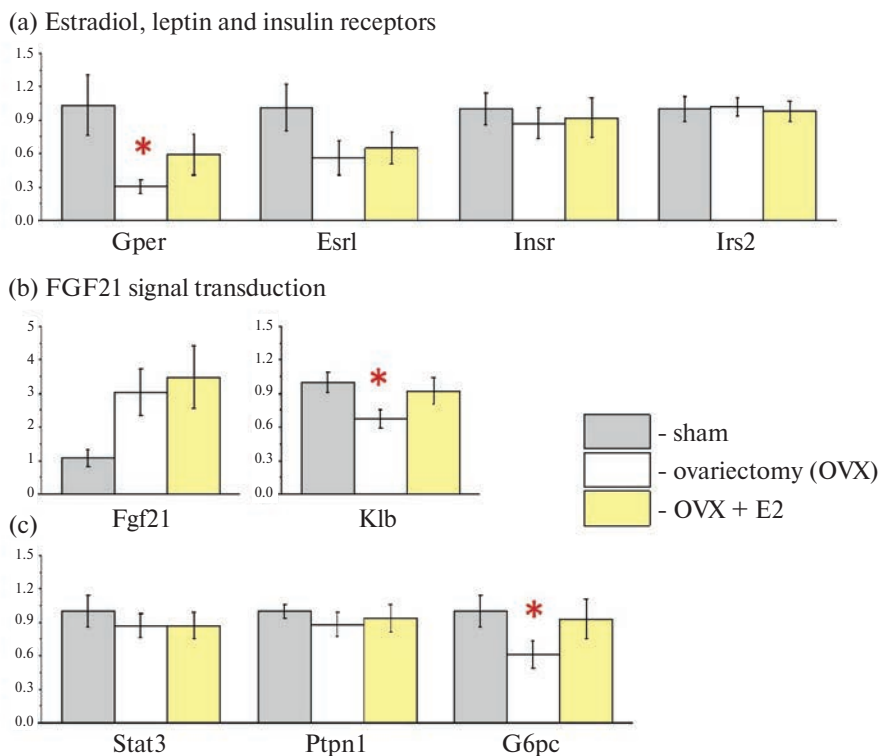


Рис. 6. Уровни мРНК генов рецепторов эстрадиола (*Gper*, *Esr1*), трансдукции сигнала инсулина (*Insr*, *Irs2*) (а), трансдукции сигнала FGF21 (*Fgf21*, *Klb*) (б), транскрипционного фактора STAT3 (*Stat3*), протенинфосфотирозинфосфатазы 1В (*Ptpn1*) и глюкоза-6-фосфатазы (*G6pc*) в печени у самок мышей линии C57Bl/6J. Самки были ложно оперированы или овариэктомированы, потребляли стандартный корм, сало и печень (диета кафетерия), получали перорально один раз в три дня в 16.00 – 16.30 эстрадиол (OVX+E2) в дозе 10 мкг/животное или только растворитель (sham и OVX). Эстрадиол начинали вводить за неделю до и вводили в течение двух недель содержания на диете кафетерия. * – $p < 0.05$ по сравнению с ложнооперированными самками (sham), *t*-test.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличение доли жиров и углеводов в потребляемой пище повышает ее калорийность. Пути адаптации к высококалорийной пище включают снижение ее потребления, повышение расхода энергии, запасание излишне потребленных калорий в виде жира. К факторам, влияющим на выбор пути адаптации, относятся, в том числе тип диеты и пол животного [4, 27]. Задачей нашего исследования было оценить роль эстрадиола на ранних этапах адаптации к диете кафетерия.

Благотворное влияние эстрадиола на углеводно-жировой обмен при ожирении хорошо известно: он снижает потребление пищи, массу тела, повышает чувствительность к инсулину [28–31]. С этим хорошо согласуются полученные нами данные о том, что накопление жировой массы и увеличение массы тела при содержании в течение двух недель на диете кафетерия было менее выражено у ЛО самок с нормальным уровнем эстрадиола по сравнению с ОЭ самками с недостаточностью эстрадиола. При этом самки не различались по количеству потребленной энергии. В совокупности эти результаты (ОЭ и ЛО самки потребляли одинаковое количество энергии, но ОЭ самки имели большую массу тела и жировой ткани) дают основание предположить снижение

расхода энергии у ОЭ самок по сравнению с ЛО самками. Кроме того, ОЭ и ЛО самки различались по вкусовым предпочтениям (ОЭ самки потребляли печенья меньше, а сала больше, чем ЛО самки), и это не было связано с различиями в чувствительности гипоталамуса к факторам, регулирующим потребление пищи: овариэктомия не повлияла на экспрессию в гипоталамусе генов рецепторов лептина, инсулина и эстрадиола. В то же время ОЭ самки отличались от ЛО самок более высоким уровнем мРНК *Pomc*. ПОМК является анорексигенным нейропептидом, однако на ранних этапах адаптации к потреблению сладкой и жирной пищи изменение вкусовых предпочтений, в том числе уменьшение потребления печенья ОЭ самками, по-видимому, не связано с активацией его экспрессии в гипоталамусе, поскольку мы не обнаружили корреляции между уровнем мРНК *Pomc* и долей энергии, потребленной с печеньем за время содержания на диете. Тем не менее активация экспрессии гипоталамического анорексигенного фактора, возможно, является компенсаторным ответом на снижение расхода энергии у ОЭ самок и может способствовать сохранению массы тела при более длительном содержании на диете.

У животных с ожирением важными антидиабетогенными эффектами эстрадиола являются повышение чувствительности к инсулину, подавление глюконеогенеза и продукции глюкозы в печени, снижение уровня в крови глюкозы и холестерина. Ключевым ферментом глюконеогенеза является глюкоза-6-фосфатаза – повышение ее уровня сопряжено с увеличением уровня глюкозы в крови. Показано, что у самок мышей с ожирением, вызванным содержанием на диете с высоким содержанием жиров, эстрадиол подавляет экспрессию в печени гена глюкоза-6-фосфатазы (*G6pc*) [32]. В нашем эксперименте уровень холестерина в крови и активность экспрессии глюкоза-6-фосфатазы действительно зависели от эстрогенного статуса, однако снижение этих показателей было ассоциировано с недостаточностью эстрадиола – уровень холестерина в крови и мРНК *G6pc* в печени были ниже у ОЭ самок по сравнению с ЛО самками. В чем причина данного феномена? Известно, что введение FGF21 животным с ожирением приводит к снижению у них уровня глюкозы и холестерина в крови [33–35]. Поэтому мы предполагаем, что при содержании на диете кафетерия сниженный уровень холестерина в крови и мРНК *G6pc* в печени у ОЭ самок по сравнению с ЛО самками объясняются более высокой активностью системы FGF21 у ОЭ самок. В пользу данного предположения говорит обнаруженная тенденция к повышению уровня FGF21 в крови у ОЭ самок по сравнению с ЛО самками и отрицательная корреляция уровня мРНК *G6pc* в печени и уровня FGF21 в крови.

Как бы ни изменялись экспрессия *G6pc* в печени и уровень FGF21 в крови, уровень глюкозы в крови был минимальным у ОЭ самок, которые получали эстрадиол (ОЭ+E2). Животных декапитировали в сытом состоянии, поэтому уровень глюкозы в крови зависел не только от ее продукции в печени, но и от ее метаболизма в жировой и мышечной тканях, в том числе от уровня в крови кортикостерона, который способствует выходу глюкозы из периферических тканей, тем самым повышая ее уровень в крови. ОЭ+E2 самки отличались от животных других экспериментальных групп, помимо глюкозы, сниженным уровнем кортикостерона в крови, и мы предполагаем, что это связано со способностью эстрадиола уменьшать тревожное и депрессивноподобное поведение у мышей [36], а значит, уменьшать стресс, вызванный процедурой введения гормона. Таким образом, низкий уровень глюкозы в крови у ОЭ+E2 самок, возможно, обусловлен низким уровнем их стрессированности и низким уровнем кортикостерона в крови.

Показано, что у животных без ожирения, потреблявших стандартный корм, эстрадиол активирует систему FGF21: в ходе эстрального цикла изменение уровня FGF21 в крови коррелирует с уровнем эндогенного эстрадиола в крови [24], а экзогенный эстрадиол при фармакологическом введении повышает экспрессию *Fgf21* в печени и уровень FGF21 в крови [25]. Заметим, однако, что у животных без ожирения, кото-

рые потребляют стандартный корм, активность системы FGF21 очень низкая. Потребление сладкой и жирной пищи активирует систему FGF21, повышает уровень FGF21 в крови в сотни раз [13], при этом эстрогенный статус, по-видимому, тоже влияет на активность системы FGF21, но это влияние отличается от такового у животных без ожирения. В нашем эксперименте самки всех экспериментальных групп потребляли сладкую и жирную пищу, при этом более высокий уровень экспрессии *Fgf21* в печени и более высокий уровень гормона в крови мы наблюдали у самок с недостаточностью эстрадиола, у ОЭ самок. Это наблюдение хорошо согласуется с данными, полученными нами ранее, о половых различиях активности системы FGF21 у животных с ожирением при длительном потреблении сладкой и жирной пищи: у самцов экспрессия *Fgf21* в печени, в бурой жировой ткани и уровень FGF21 в крови были выше, чем те же показатели у самок [4, 13].

Таким образом, данные о влиянии овариэктомии на экспрессию в печени и уровень FGF21 в крови наводят на мысль о том, что эстрадиол, возможно, подавляет активность системы FGF21. Однако экзогенный эстрадиол оказался не способен предотвратить влияние овариэктомии на массу тела, массу жира, на вкусовые предпочтения и в том числе на экспрессию *Fgf21* в печени. Отсутствие эффекта эстрадиола на экспрессию *Fgf21* в печени может быть следствием снижения в печени у ОЭ самок уровня рецепторов эстрадиола, мембранных (*Gper*) и ядерных (*Esr1*). Кроме того, отсутствие эффектов экзогенного гормона может объясняться тем, что ряд своих эффектов эстрадиол оказывает только при совместном введении с прогестероном. Например, клетки вкусовых рецепторов являются прямой мишенью эстрадиола [37], но для зависимого от пола выбора рациона питания (female specific diet choice patterns) необходимо действие обоих гормонов (эстрадиола и прогестерона) одновременно [38]. Прогестерон также может способствовать влиянию эстрадиола на экспрессию генов, например, низкие дозы эстрадиола не влияют на экспрессию гена транспортера глюкозы четвертого типа (инсулин-регулируемый транспортер глюкозы, *GLUT4/Slc2a4*) в жировой ткани, тогда как высокие дозы эстрадиола ее подавляют, и прогестерон усиливает его эффект [39]. Помимо этого, отсутствие эффектов эстрадиола может быть обусловлено особенностями экспериментальной модели и выбранной дозой эстрадиола (мы стремились, чтобы доза гормона была физиологичной).

Каков может быть смысл в меньшей активации системы FGF21 у животных с нормальным уровнем эстрадиола при адаптации к потреблению сладкой и жирной пищи? Возможно, у животных с нормальным уровнем эстрадиола, который оказывает нормализующее влияние на углеводно-жировой обмен, адаптация к высококалорийной диете не требует дополнительной активации системы FGF21, тогда как при снижении уровня эстрадиола ее активность компенсаторно возрастает.

Помимо экспрессии в печени и уровня гормона в крови, активность системы FGF21 определяется чувствительностью органов и тканей к действию FGF21, а именно количеством рецепторов (FGFR1) и корецепторов бета-клото (KLB). Еще Fisher и соавт. высказали предположение, что ожирение является состоянием резистентности к действию FGF21 [40], а Hale и соавт. предложили считать ожирение не состоянием полной резистентности к FGF21, а скорее состоянием сниженной чувствительности к FGF21 [41]. Позднее было показано, что гиперэкспрессия корецепторов бета-клото в жировой ткани повышает чувствительность самцов мышей к эндогенному FGF21 и обеспечивает защиту от ожирения, вызванного диетой [42]. Мы обнаружили, что овариэктомия и эстрадиол повлияли на экспрессию корецепторов бета-клото (*Klb*) и в печени, и в гипоталамусе, причем в обоих случаях изменение экспрессии свидетельствовало о стимулирующем влиянии эстрадиола: состояние, характеризующееся недостаточностью эстрадиола, было ассоциировано со сниженным уровнем мРНК *Klb* в гипоталамусе и в печени, тогда как ЛО самки, имеющие нормальный уровень эстрадиола, и ОЭ самки, получавшие эстрадиол, имели одина-

ковый и более высокий, чем у ОЭ самок, уровень мРНК *Klb*. Эта способность эстрадиола повышать уровень *Klb* в печени и в гипоталамусе у самок во время адаптации к содержанию на диете кафетерия на фоне диет-индуцированной активации системы FGF21 отчасти согласуется с данными, полученными нами ранее о том, что у ОЭ самок с ожирением, индуцированным потреблением сладкой и жирной пищи в течение 8 недель, эстрадиол повышает уровень *Klb* в гипоталамусе, причем его эффект существенно более выражен на фоне высокого уровня FGF21 – при совместном введении эстрадиола и FGF21 [26]. Повышение уровня корецепторов бета-клото способствует сенсibilизации тканей к действию FGF21. Следовательно, при адаптации к диете кафетерия эстрадиол может повышать чувствительность к FGF21 в печени и в гипоталамусе. Показано, что центральные эффекты FGF21 опосредуют его влияние на вкусовые предпочтения и углеводный метаболизм в печени [20, 43, 44]. Может ли FGF21 оказывать эффекты непосредственно в печени, единого мнения нет [19, 45], поскольку в норме экспрессия рецептора FGFR1 в печени очень низкая [46]. В печени высокий уровень экспрессии FGFR4, который также способен связываться с FGF21 и с корецептором бета-клото, но аффинность связывания FGF21 и FGFR4 очень низкая [19]. Однако влияние FGF21 в печени, возможно, усиливается в условиях метаболического стресса и многократного увеличения уровня FGF21 в крови. Кроме того, комплекс KLB-FGFR4 опосредует в печени эффекты другого фактора роста фибробластов – FGF15 (ортолог FGF19 у человека), который, как и FGF21, является гормоном, принадлежит к тому же семейству, постпрандиально продуцируется в подвздошной кишке и регулирует метаболизм желчных кислот и глюкозы в печени [20, 47].

Таким образом, при адаптации к содержанию на диете кафетерия эстрогенный статус самки, по-видимому, может влиять на чувствительность печени и гипоталамуса к действию FGF21: в условиях резкого повышения уровня FGF21 в крови, стимулированного потреблением сладкой и жирной пищи, эстрадиол активирует экспрессию корецептора бета-клото, тем самым препятствуя развитию резистентности к FGF21, повышая устойчивость к пролонгированному действию диеты.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Т. В. Я. – планирование и проведение эксперимента, иммуноферментный анализ показателей крови, обработка данных, написание статьи, А. Ю. К. – RT-ПЦР, К. Ю. М. – флуориметрический анализ показателей крови, определение содержания триглицеридов и гликогена в печени, Н. М. Б. – идея эксперимента, анализ данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект № 23-15-00093). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института цитологии и генетики СО РАН, протокол № 76 от 07.04.2021 г. «Поло-возрастные особенности адаптации к потреблению высокого уровня жиров и углеводов у мышей линии c57BL».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gadde KM, Martin CK, Berthoud HR, Heymsfield SB* (2018) Obesity: Pathophysiology and Management. *J Am Coll Cardiol* 71(1): 69–84.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.011>
2. *Bruder-Nascimento T, Ekeledo OJ, Anderson R, Le HB, Belin de Chantemèle EJ* (2017) Long Term High Fat Diet Treatment: An Appropriate Approach to Study the Sex-Specificity of the Autonomic and Cardiovascular Responses to Obesity in Mice. *Front Physiol* 8: 32.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00032>
3. *Hwang LL, Wang CH, Li TL, Chang SD, Lin LC, Chen CP, Chen CT, Liang KC, Ho IK, Yang WS, Chiou LC* (2010) Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. *Obesity (Silver Spring)* 18(3): 463–469.
<https://doi.org/10.1038/oby.2009.273>
4. *Bazhan NM, Yakovleva TV, Dubinina AD, Makarova EN* (2020) Impact of sex on the adaptation of adult mice to long consumption of sweet-fat diet. *Vavilov Zhurn Genet Selekt* 24(8): 844–852.
<https://doi.org/10.18699/VJ20.682>
5. *Tramunt B, Smati S, Grandgeorge N, Lenfant F, Arnal JF, Montagner A, Gourdy P* (2020) Sex differences in metabolic regulation and diabetes susceptibility. *Diabetologia* 63(3): 453–461.
<https://doi.org/10.1007/s00125-019-05040-3>
6. *Freire-Regatillo A, Fernández-Gómez MJ, Díaz F, Barrios V, Sánchez-Jabonero I, Frago LM, Argente J, García-Segura LM, Chowen JA* (2020) Sex differences in the peripubertal response to a short-term, high-fat diet intake. *J Neuroendocrinol* 32(1): e12756.
<https://doi.org/10.1111/jne.12756>
7. *Huang KP, Ronveaux CC, Knotts TA, Rutkowski JR, Ramsey JJ, Raybould HE* (2020) Sex differences in response to short-term high fat diet in mice. *Physiol Behav* 221: 112894.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112894>
8. *Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N* (2000) Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta* 1492(1): 203.
[https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00067-1)
9. *Zhang P, Kuang H, He Y, Idiga SO, Li S, Chen Z, Yang Z, Cai X, Zhang K, Potthoff MJ, Xu Y, Lin JD* (2018) NRG1-Fc improves metabolic health via dual hepatic and central action. *JCI Insight* 3(5): e98522.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.98522>
10. *Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, Goetz R, Mohammadi M, Kuroo M, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA* (2010) Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol* 24(10): 2050.
<https://doi.org/10.1210/me.2010-0142>
11. *Johnson CL, Weston JY, Chadi SA, Fazio EN, Huff MW, Kharitonov A, Köester A, Pin CL* (2009) Fibroblast growth factor 21 reduces the severity of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 137(5): 1795–1804.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.064>
12. *Patel V, Adya R, Chen J, Ramanjaneya M, Bari MF, Bhudia SK, Hillhouse EW, Tan BK, Rande-va HS* (2014) Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts. *PLoS One* 9(2): e87102.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087102>
13. *Bazhan N, Yakovleva T, Balyibina N, Dubinina A, Denisova E, Feofanova N, Makarova E* (2019) Sex Dimorphism in the Fgf21 Gene Expression in Liver and Adipose Tissues is Dependent on the Metabolic Condition. *Online J Biol Sci* 19(1): 28–36.
14. *Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB* (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 115(6): 1627–1635.
<https://doi.org/10.1172/JCI23606>
15. *Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliewer SA, Kuro-o M* (2007) Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* 282(37): 26687.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M704165200>
16. *Suzuki M, Uehara Y, Motomura-Matsuzaka K, Oki J, Koyama Y, Kimura M, Asada M, Komi-Kuramochi A, Oka S, Imamura T* (2008) betaKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol Endocrinol* 22(4): 1006.
<https://doi.org/10.1210/me.2007-0313>

17. Bookout AL, de Groot MH, Owen BM, Lee S, Gautron L, Lawrence HL, Ding X, Elmquist JK, Takahashi JS, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2013) FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med* 19(9): 1147.
<https://doi.org/10.1038/nm.3249>
18. Jensen-Cody SO, Flippo KH, Clafflin KE, Yavuz Y, Sapouckey SA, Walters GC, Usachev YM, Atasoy D, Gillum MP, Potthoff MJ (2020) FGF21 Signals to Glutamatergic Neurons in the Ventromedial Hypothalamus to Suppress Carbohydrate Intake. *Cell Metab* 32(2): 273–286.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.008>
19. Yang ZH, Miyahara H, Takeo J, Katayama M (2012) Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetol Metab Syndr* 4(1): 32.
<https://doi.org/10.1186/1758-5996-4-32>
20. Lan T, Morgan DA, Rahmouni K, Sonoda J, Fu X, Burgess SC, Holland WL, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ (2017) FGF19, FGF21, and an FGFR1/ β -Klotho-Activating Antibody Act on the Nervous System to Regulate Body Weight and Glycemia. *Cell Metab* 26(5): 709–718.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.005>
21. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, Kharitonov A (2008) Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149(12): 6018–6027.
<https://doi.org/10.1210/en.2008-0816>
22. Larson KR, Chaffin AT, Goodson ML, Fang Y, Ryan KK (2019) Fibroblast Growth Factor-21 Controls Dietary Protein Intake in Male Mice. *Endocrinology* 160(5): 1069–1080.
<https://doi.org/10.1210/en.2018-01056>
23. Von Holstein-Rathlou S, Gillum MP (2019) Fibroblast growth factor 21: an endocrine inhibitor of sugar and alcohol appetite. *J Physiol* 597(14): 3539–3548.
<https://doi.org/10.1113/JP277117>
24. Hua L, Zhuo Y, Jiang D, Li J, Huang X, Zhu Y, Li Z, Yan L, Jin C, Jiang X, Che L, Fang Z, Lin Y, Xu S, Li J, Feng B, Wu D (2018) Identification of hepatic fibroblast growth factor 21 as a mediator in 17 β -estradiol-induced white adipose tissue browning. *FASEB J* 32(10): 5602–5611.
<https://doi.org/10.1096/fj.201800240R>
25. Allard C, Bonnet F, Xu B, Coons L, Albarado D, Hill C, Fagherazzi G, Korach KS, Levin ER, Lefante J, Morrison C, Mauvais-Jarvis F (2019) Activation of hepatic estrogen receptor- α increases energy expenditure by stimulating the production of fibroblast growth factor 21 in female mice. *Mol Metab* 22: 62–70.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.02.002>
26. Jakovleva TV, Kazantseva AY, Dubinina AD, Balybina NY, Baranov KO, Makarova EN, Bazhan NM (2022) Estradiol-dependent and independent effects of FGF21 in obese female mice. *Vavilov Zhurn Genet Selekt* 26(2): 159–168.
<https://doi.org/10.18699/VJGB-22-20>
27. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, 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(6): 1109–1117.
<https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>
28. Gao H, Bryzgalova G, Hedman E, Khan A, Efendic S, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K (2006) Long-term administration of estradiol decreases expression of hepatic lipogenic genes and improves insulin sensitivity in ob/ob mice: a possible mechanism is through direct regulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Endocrinol* 20(6): 1287–1299.
<https://doi.org/10.1210/me.2006-0012>
29. Thammacharoen S, Geary N, Lutz TA, Ogawa S, Asarian L (2009) Divergent effects of estradiol and the estrogen receptor- α agonist PPT on eating and activation of PVN CRH neurons in ovariectomized rats and mice. *Brain Res* 1268: 88–96.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.067>
30. Kim JY, Jo KJ, Kim OS, Kim BJ, Kang DW, Lee KH, Baik HW, Han MS, Lee SK (2010) Parenteral 17 β -estradiol decreases fasting blood glucose levels in non-obese mice with short-term ovariectomy. *Life Sci* 87(11-12): 358–366.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.07.009>
31. Roesch SL, Styer AM, Wood GC, Kosak Z, Seiler J, Benotti P, Petrick AT, Gabrielsen J, Strodel WE, Gerhard GS, Still CD, Argyropoulos G (2015) Perturbations of fibroblast growth factors 19 and 21 in type 2 diabetes. *PloS One* 10(2): e0116928.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116928>

32. Bryzgalova G, Lundholm L, Portwood N, Gustafsson JA, Khan A, Efendic S, Dahlman-Wright K (2008) Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(4): E904–E912.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.90248.2008>
33. Fisher FM, Maratos-Flier E (2016) Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol* 78: 223–241.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105339>
34. Makarova E, Kazantseva A, Dubinina A, et al. (2021) The Same Metabolic Response to FGF21 Administration in Male and Female Obese Mice Is Accompanied by Sex-Specific Changes in Adipose Tissue Gene Expression. *Int J Mol Sci* 22(19): 10561.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910561>
35. Liu C, Schönke M, Zhou E, Li Z, Kooijman S, Boon MR, Larsson M, Wallenius K, Dekker N, Barlind L, Peng XR, Wang Y, Rensen PCN (2022) Pharmacological treatment with FGF21 strongly improves plasma cholesterol metabolism to reduce atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 118(2): 489–502.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvab076>
36. Walf AA, Frye CA (2010) Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. *Physiol Behav* 99(2): 169–174.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.017>
37. Dahir NS, Calder AN, McKinley BJ, Liu Y, Gilbertson TA (2021) Sex differences in fat taste responsiveness are modulated by estradiol. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 320(3): E566–E580.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00331.2020>
38. Yang TY, Liang NC (2018) Ovarian hormones mediate running-induced changes in high fat diet choice patterns in female rats. *Horm Behav* 100: 81–93.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.02.010>
39. Sugaya A, Sugiyama T, Yanase S, Shen XX, Minoura H, Toyoda N (2000) Expression of glucose transporter 4 mRNA in adipose tissue and skeletal muscle of ovariectomized rats treated with sex steroid hormones. *Life Sci* 66(7): 641–648.
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00636-0](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00636-0)
40. Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitonov A, Flier JS, Maratos-Flier E (2010) Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* 59(11): 2781–2789.
<https://doi.org/10.2337/db10-0193>
41. Hale C, Chen MM, Stanislaus S, Chinookoswong N, Hager T, Wang M, Véniant MM, Xu J (2012) Lack of overt FGF21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. *Endocrinology* 153(1): 69–80.
<https://doi.org/10.1210/en.2010-1262>
42. Samms RJ, Cheng CC, Kharitonov A, Gimeno RE, Adams AC (2016) Overexpression of β -Klotho in Adipose Tissue Sensitizes Male Mice to Endogenous FGF21 and Provides Protection From Diet-Induced Obesity. *Endocrinology* 157(4): 1467–1480.
<https://doi.org/10.1210/en.2015-1722>
43. Santoso P, Nakata M, Shiizaki K, Boyang Z, Parmila K, Otgon-Uul Z, Hashimoto K, Satoh T, Mori M, Kuro-o M, Yada T (2017) Fibroblast growth factor 21, assisted by elevated glucose, activates paraventricular nucleus NUCB2/Nesfatin-1 neurons to produce satiety under fed states. *Scient Rep* 7: 45819.
<https://doi.org/10.1038/srep45819>
44. BonDurant LD, Potthoff MJ (2018) Fibroblast Growth Factor 21: A Versatile Regulator of Metabolic Homeostasis. *Annu Rev Nutr* 38: 173–196.
<https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064800>
45. Liang Q, Zhong L, Zhang J, Wang Y, Bornstein SR, Triggie CR, Ding H, Lam KS, Xu A (2014) FGF21 maintains glucose homeostasis by mediating the cross talk between liver and brain during prolonged fasting. *Diabetes* 63(12): 4064–4075.
<https://doi.org/10.2337/db14-0541>
46. Ornitz DM, Itoh N (2015) The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4(3): 215–266.
<https://doi.org/10.1002/wdev.176>
47. Potthoff MJ, Boney-Montoya J, Choi M, He T, Sunny NE, Satapati S, Suino-Powell K, Xu HE, Gerard RD, Finck BN, Burgess SC, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2011) FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1 α pathway. *Cell Metab* 13(6): 729–738.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.019>

Effect of Estradiol on Carbohydrate-Fat Metabolism and FGF21 System Activity in Female C57BL/6 Mice with Short-Term Consumption of the Cafeteria Diet**T. V. Jakovleva^{a,*}, A. Yu. Kazantseva^a, K. Yu. Mamontova^{a,b}, and N. M. Bazhan^{a,b}**^a*Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia*^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia***e-mail: tatyana.jakovleva@yandex.ru*

The cafeteria diet contributes to the development of obesity and metabolic syndrome, reduces insulin sensitivity and glucose tolerance. Hepatic hormone fibroblast growth factor 21 (FGF21) promotes adaptation to the consumption of sweet and fatty foods. Female mice are less sensitive to the damaging effects of the cafeteria diet than males, which may be due to the effect of estradiol on the activity of the FGF21 system: on the hepatic expression of the *Fgf21* gene, on the blood level of hormone, or on the levels of receptors and coreceptors beta-clotho, which determine the sensitivity of tissues to FGF21. The purpose of this work was to verify this assumption. The effect of estradiol (10 mg/animal once every three days) was evaluated in ovariectomized female C57BL/6 mice who consumed a cafeteria diet (standard food, lard and cookies) for two weeks. Indicators of carbohydrate-fat metabolism, taste preferences, and activity of the FGF21 system were determined. Ovariectomy increased body weight and subcutaneous adipose tissue weight, fat intake, *Pomc* expression in the hypothalamus, decreased expression of estradiol receptors in the liver and cookie consumption. Estradiol did not have a significant effect on these parameters. In ovariectomized females with estradiol deficiency, blood cholesterol levels and liver expression of the glucose-6-phosphatase gene were lower than in sham operated females, and estradiol normalized these parameters. Ovariectomy lowered, and the administration of estradiol increased the level of coreceptor beta-clotho (*Klb*) mRNA in the liver and in the hypothalamus. These results suggest that at the initial stages of consumption of sweet and fatty foods, estradiol increases the sensitivity of the liver and hypothalamus to FGF21 and thereby enhances the contribution of the FGF21 system to the processes of adaptation to the cafeteria diet.

Keywords: cafeteria diet, ovariectomy, estradiol, FGF21, taste preferences, coreceptor beta-clotho

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ КУРСОВОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТФОРМИНА
В КОМБИНАЦИИ С ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫМ ИНСУЛИНОМ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ, ВЫЗВАННЫМ «КАФЕТЕРИЙ-ДИЕТОЙ»**

© 2024 г. К. В. Деркач^{1, *}, И. И. Зорина¹, А. О. Шпаков^{1, 2}

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

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
* E-mail: derkach_k@list.ru

Поступила в редакцию 28.01.2024 г.

После доработки 22.02.2024 г.

Принята к публикации 12.03.2024 г.

«Кафетерий-диета», включающая избыток насыщенных жиров и легкоусвояемых углеводов, приводит к ожирению и является фактором риска для развития сахарного диабета 2-го типа. Для коррекции диета-индуцированного ожирения (ДИО) часто используют метформин (МФ), но у части пациентов он вызывает серьезные побочные эффекты, что требует снижения его доз, в том числе путем совместного применения с препаратами, потенцирующими эффекты МФ. Кандидатом на роль таких препаратов является интраназально вводимый инсулин (ИВИ), который и сам обладает восстанавливающим потенциалом при лечении метаболических расстройств. Целью работы было изучить эффективность совместного трехнедельного применения МФ (100 мг/кг/сутки, перорально) с ИВИ в двух дозах (1.5 и 6.0 МЕ/кг/сутки) для коррекции метаболических и гормональных нарушений у самцов крыс с ДИО, вызванным «кафетерий-диетой». Показано, что у крыс с ДИО комбинация МФ и ИВИ нормализовала массу тела и абдоминального жира, восстанавливала глюкозный гомеостаз, показатели липидного обмена, базовые и стимулированные глюкозой уровни инсулина и лептина. В сравнении с монотерапией МФ, совместное применение МФ и ИВИ более эффективно восстанавливало чувствительность к инсулину, оцениваемую по снижению индекса инсулиновой резистентности, а также нормализовало толерантность к глюкозе, оцениваемую по снижению значения AUC_{0-120} интегрированной площади под глюкозными концентрационными кривыми в глюкозотолерантном тесте. Комбинация МФ с ИВИ в дозе 1.5 МЕ/кг/сутки нормализовала гормональный статус тиреоидной системы, нарушенный при ДИО, в то время как комбинация МФ с ИВИ в дозе 6 МЕ/кг/сутки усугубляла гипотиреоидное состояние в основном вследствие гиперактивации секреции тиреотропного гормона и развития резистентности к нему щитовидной железы. Тем самым для коррекции метаболических и гормональных показателей при ДИО, в том числе для восстановления функций тиреоидной системы, перспективным является применение МФ со сравнительно низкими дозами ИВИ, не оказывающими негативного влияния на тиреоидную ось.

Ключевые слова: метформин, интраназальный инсулин, ожирение, высококалорийная диета, инсулиновая резистентность, гиперлептинемия, тиреоидный гормон, тиреотропный гормон, самцы крыс, эндокринная система

DOI: 10.31857/S0869813924040067, **EDN:** CNPBPA

ВВЕДЕНИЕ

Высококалорийная диета, включающая избыточное содержание насыщенных жиров и легкоусвояемые углеводы (сахарозу, фруктозу и др.), называемая также «кафетерий-диетой», приводит к ожирению, которое является фактором риска для развития в дальнейшем метаболического синдрома (МС) и сахарного диабета 2-го типа (СД2), в том числе в молодом возрасте. Несмотря на хорошую изученность этиологии и патогенеза диета-индуцированного ожирения (ДИО) и использование в клинике различных подходов для его коррекции, включающих фармакологические препараты, бариатрическую хирургию, специальные комплексы физических нагрузок, проблема разработки новых, более эффективных подходов для лечения и предотвращения ожирения остается весьма актуальной, тем более, что число пациентов с патологическими формами ожирения неуклонно возрастает как в России, так и в мире в целом. Так, каждый пятый житель нашей планеты имеет избыточную массу тела или страдает ожирением [1]. Более того, по данным ВОЗ, ожирение выявлено у 44% пациентов с СД2, у 23% пациентов с ишемической болезнью сердца, а также у 7–41% пациентов с различными формами онкологических заболеваний [2].

Одним из фармакологических препаратов, широко и успешно применяемых для лечения ожирения, является бигуанид метформин (МФ), который повышает чувствительность к инсулину и лептину, нарушенную при ожирении, способствует нормализации массы тела, углеводного и липидного метаболизма [3]. МФ нормализует глюкозный гомеостаз путем снижения продукции глюкозы гепатоцитами и всасывания глюкозы в желудочно-кишечном тракте, а также вследствие усиления инсулин-опосредуемой утилизации глюкозы тканями [3, 4]. Последнее во многом определяется ослаблением инсулиновой резистентности (ИР) при ожирении [3, 5]. Помимо улучшения метаболического статуса пациентов, МФ также положительно влияет на функции эндокринной системы, которые в различной степени нарушаются при ожирении и ассоциированных с ним эндокринных расстройствах (синдром поликистозных яичников, андрогенная недостаточность у мужчин, нарушения функций щитовидной железы и др.) [3, 6, 7].

Однако применение МФ имеет ряд ограничений. Одни из них обусловлены низкой чувствительностью к МФ части пациентов, в среднем 30–40%. Это вызвано рядом причин, в том числе инактивирующими мутациями в молекулах транспортеров органических катионов OAT1, OAT2, MATE1 и MATE2, которые опосредуют транспорт МФ внутрь клетки, к основным мишеням его действия, а также в гене *ATM* (*ataxia-telangiectasia mutated*), ответственном за функциональный ответ клетки на воздействие МФ [8–10]. Другие ограничения обусловлены побочными эффектами МФ терапии, в том числе при длительном использовании сравнительно высоких доз препарата, среди которых нарушения функционирования желудочно-кишечного тракта и в ряде случаев явления лактоацидоза [11–13]. Все это требует разработки подходов для повышения эффективности МФ терапии при условии снижения дозы препарата, и здесь определенные успехи достигнуты в отношении применения комбинированной терапии, когда МФ используется совместно с препаратами, которые сами обладают терапевтическим потенциалом при лечении ожирения (не обязательно совпадающим с таковым у МФ) и наряду с этим способны потенцировать эффекты МФ, действуя на мишени МФ прямо или опосредованно. Среди наиболее удачных таких комбинаций можно привести совместное применение МФ и ситаглиптина, высокоселективного ингибитора дипептидилпептидазы 4-го типа, повышающего уровни глюкагоноподобного пептида и глюкоза-зависимого инсулинотропного пептида, что вносит дополнительный вклад в восстановление инсулиновой чувствительности и глюкозного гомеостаза при ожирении, СД2 и других метаболических расстройствах [14], а также комбинирование МФ терапии с тиазолидинами, сахароснижающими препаратами [15].

Ранее нами были получены данные об эффективности интраназально вводимого инсулина (ИВИ) для коррекции метаболических и гормональных нарушений при ДИО и МС с ожирением [16–18]. Этот эффект ИВИ обусловлен восстановлением активности инсулиновой системы в гипоталамусе и других отделах мозга, ослабленной при ожирении, МС и СД2 вследствие нарушения транспорта циркулирующего в крови инсулина через гематоэнцефалический барьер и развития центральной ИР [19, 20]. Однако эффективность монотерапии ИВИ в отношении снижения массы тела и нормализации показателей липидного обмена при МС и СД2 была сравнительно низкой, в то время как ИВИ оказывал значимый эффект на функциональную активность тиреоидной оси и толерантность к глюкозе [18, 21, 22]. На модели СД2, вызванного высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина, нами было показано, что совместное применение МФ и ИВИ оказывается более эффективным в отношении восстановления ряда показателей в сравнении с монотерапией этими препаратами [23]. Другими авторами установлено, что комбинированное использование МФ и ИВИ было эффективным при коррекции ИР, которая вызывалась обработкой крыс дексаметазоном [24]. Все это указывает на возможность потенцирования эффекта МФ с помощью ИВИ при коррекции метаболических и гормональных показателей у крыс с ДИО. В связи с этим целью работы было изучить эффективность курсового применения различных доз ИВИ совместно с МФ (100 мг/кг/сутки, перорально) для коррекции метаболических и гормональных нарушений у самцов крыс с ожирением, вызванным «кафетерий-диетой». В качестве метаболических показателей были изучены масса тела и жировой ткани, уровень триглицеридов и общего холестерина, содержание глюкозы в крови до и после глюкозной нагрузки, глюкозотолерантность. Был изучен гормональный статус тиреоидной и гонадной осей, а также содержание инсулина и лептина в плазме крови крыс. В случае ИВИ были избраны две дозы – относительно низкая, 1.5 МЕ/кг, оказывающая значимое влияние на когнитивный дефицит у крыс [25], и относительно высокая, 6.0 МЕ/кг, значимо влияющая на уровни глюкозы и инсулина в крови животных [26, 27]. У пациентов также продемонстрирован сходный паттерн физиологических эффектов ИВИ на функции ЦНС и метаболические показатели [28].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для создания модели ожирения были выбраны самцы крыс линии Wistar, которым с возраста 26 дней (перевод с грудного вскармливания на стандартный корм) начинали давать высокожировую смесь и вместо питьевой воды 30%-ный раствор сахарозы. Крыс содержали в стандартных условиях вивария (соотношение день/ночь – 12 ч/12 ч, температура 22 ± 2 °C) в пластиковых клетках при свободном доступе к воде и сухому корму, по шесть животных в одной клетке. Стандартный сухой корм представлял собой полноценный комбикорм ПК 120-2 243 для содержания лабораторных животных производства ООО «Лабораторкорм» (Москва, Россия), в то время как 1 кг высокожировой смеси имел следующий состав – 524 г свиного сала, 417 г творога, 50 г печени, 5.3 г L-метионина, 1.85 г пекарских дрожжей и 1.85 г хлорида натрия [29]. Ежедневно животные контрольной группы потребляли по 20–25 г сухого корма, в то время как крысы с высококалорийной диетой на фоне потребления раствора сахарозы ежедневно потребляли 7–8 г высокожировой смеси и 3–8 г стандартного сухого корма.

По достижении самцами крыс возраста 4 месяцев оценивали развитие ожирения и признаков МС, для чего проводили интраперитонеальный глюкозотолерантный тест (игТТ). В ходе игТТ животным в/б вводили глюкозу в дозе 2 г/кг массы тела, при этом измеряли уровни глюкозы в крови до и через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после глюкозной нагрузки. Концентрацию глюкозы измеряли с помощью тест-полосок «One Touch Select» (США) и глюкометра («Life Scan Johnson & Johnson», Дания). Наряду с этим оценивали массу тела животных (мониторинг этого показателя осуществляли ежеме-

сячно, начиная с однемесечного возраста). В группу с развившимся ожирением были включены крысы с массой тела, повышенной не менее чем на 10% в сравнении со средним показателем массы тела в контрольной группе, которая получала стандартный корм, и уровнем глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки в иГТТ не менее 6.5 ммоль/л. Из выборки были также исключены два животных с массой тела, превышающей контрольные значения более чем на 30%. Тем самым из первоначальной выборки были отобраны около 65% животных, которых затем рандомизировали на экспериментальные группы. Были сформированы контрольная группа (С) и 6 экспериментальных групп – ожирение без лечения (Ob), ожирение с трехнедельным лечением МФ в суточной дозе 100 мг/кг (ObM) или двумя суточными дозами ИВИ – 1.5 и 6.0 МЕ/кг (ObI1.5, ObI6), ожирение с трехнедельным лечением совместно с МФ в суточной дозе 100 мг/кг и ИВИ в двух суточных дозах 1.5 и 6.0 МЕ/кг (ObMI1.5, ObMI6). В каждой группе было по 6 животных. МФ растворяли в воде и вводили перорально через желудочный зонд, инсулин растворяли в 0.1 М Na-цитратном буфере (pH 4.5) и вводили по каплям в обе ноздри (в каждую по 10–20 мкл) [26]. Крысы групп С и Ob вместо препаратов получали их растворители.

За 3 дня до окончания эксперимента с помощью иГТТ повторно оценивали толерантность к глюкозе и с помощью наборов «Rat Insulin ELISA» («Mercodia», Швеция) и ELISA for Leptin, Rat («Cloud-Clone Corp.», США) измеряли уровни инсулина и лептина в плазме крови до и через 120 мин после введения глюкозы. Пробоподготовку и измерение уровня гормонов в плазме крови с помощью ИФА здесь и далее проводили в соответствии с рекомендациями фирм-производителей. Индекс ИР оценивали как произведение концентраций глюкозы (ммоль/л) и инсулина (нг/мл) до (базовый, ИР-0) и через 120 мин после глюкозной нагрузки (ИР-120). Кровь для определения уровней инсулина и лептина забирали из хвостовой вены под местным наркозом, для чего животным местно вводили раствор лидокаина в дозе 2–4 мг/кг массы тела. До проведения иГТТ (натощак) в крови с помощью тест-полосок Triglycerides multiCare-in и Cholesterol multiCare-in («Biochemical Systems International», Италия) оценивали уровни триглицеридов и общего холестерина, а с помощью набора «Multi Test HbA1c System kit» («Polymer Technology Systems», США) – содержание гликированного гемоглобина (HbA1c).

За день до выведения из эксперимента в крови животных оценивали уровни лютеинизирующего гормона (ЛГ) (в 11.00) с помощью набора «ELISA for LH, Rat» («Cloud-Clone Corp.», США) и тестостерона (в 11.00 и 15.00) с использованием набора «Тестостерон-ИФА» («АлкорБио», Россия). Как и в случае определения уровней инсулина и лептина, кровь для оценки уровней ЛГ и тестостерона забирали из хвостовой вены под лидокаиновым наркозом.

Затем животных наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг массы тела, в/б), декапитировали и оценивали массу абдоминального жира. В крови наркотизированных животных, взятой из шейной вены непосредственно перед декапитацией, измеряли уровни тиреотропного гормона (ТТГ) с помощью набора «Rat Thyroid Stimulating Hormone ELISA» («Cusabio Biotech Co.», Китай) и тиреоидных гормонов – свободного тироксина (fT4) и общего трийодтиронина (tT3), используя наборы фирмы «АлкорБио» (Россия).

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программы «IBM SPSS Statistics 26» («IBM», Armonk, NY, США). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка и критерия Ливиня на равенство дисперсий. Большинство данных имели нормальное распределение (за исключением концентрации ТТГ и HbA1c) и были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа Анова с применением теста Tukey. Результаты представляли как $M \pm SEM$. Для сравнения выборок с ненормальным распределением применяли непараметрический медианный тест. Данные представляли как медиана и межквартильный размах (25%; 75%). Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У крыс группы Ob без обработки МФ и ИВИ масса тела и абдоминального жира и уровни триглицеридов и общего холестерина были выше, чем в контрольной группе (табл. 1).

Уровни глюкозы натощак и через 120 мин после глюкозной нагрузки, содержание HbA1c и значение AUC_{0-120} для глюкозных кривых в иГТТ у крыс группы Ob были выше, что указывает на нарушенную толерантность к глюкозе (табл. 2, рис. 1). Базовые и стимулированные глюкозой концентрации инсулина и лептина в крови крыс группы Ob в сравнении с контролем были повышены, в большей степени в случае лептина, что указывает на отчетливо выраженную гиперинсулинемию и гиперлептинемию и сниженную чувствительность к инсулину и лептину (табл. 3). В пользу снижения чувствительности к инсулину свидетельствуют значимо повышенные значения индекса IP в группе Ob (табл. 3).

Трехнедельная обработка МФ приводила к значимому снижению массы тела и жировой ткани, уровней триглицеридов и общего холестерина в крови и улучшала толерантность к глюкозе, снижая уровень глюкозы через 120 мин после глюкозной нагрузки (табл. 1, 2, рис. 1). Уровень глюкозы натощак и значение AUC_{0-120} в группе ObM имели тенденцию к снижению, но достоверно от группы Ob не отличались, хотя и не отличались от группы C (табл. 2). Повышенные при ожирении уровни инсулина, как базовый, так и стимулированный глюкозой в группе ObM снижались, хотя в случае базового уровня отличие от группы Ob не было значимым (табл. 3). Это указывает на улучшение чувствительности к инсулину и подтверждается снижением индексов IP-0 и IP-120, которые в группе ObM были на 33 и 55% ниже, чем в группе Ob (табл. 3).

Обработка ИВИ в дозе 1.5 МЕ/кг/сутки в течение 3 недель не приводила к существенному снижению массы тела и жировой ткани, уровней триглицеридов и общего холестерина, в то время как ИВИ в дозе 6.0 МЕ/кг/сутки значимо снижал массу абдоминального жира и уровень общего холестерина (табл. 1). В группах ObI1.5 и ObI6 отмечали улучшение толерантности к глюкозе, но, как и в случае монотерапии МФ, различия значения AUC_{0-120} с группой Ob не были значимыми (табл. 2, рис. 1). В груп-

Таблица 1. Масса тела и жировой ткани и уровень триглицеридов и общего холестерина в крови у крыс с ожирением и влияние на них лечения МФ и ИВИ в двух дозах, совместно и раздельно

Группа крыс	Масса тела, г	Масса АЖ, г	Триглицериды, ммоль/л	Общий холестерин, ммоль/л
C	403.3 ± 8.1	7.8 ± 0.4	1.90 ± 0.08	4.18 ± 0.17
Ob	484.7 ± 10.7 ^a	16.3 ± 0.9 ^a	3.14 ± 0.15 ^a	6.21 ± 0.41 ^a
ObM	440.8 ± 8.0 ^b	10.1 ± 0.7 ^b	2.39 ± 0.12 ^b	4.64 ± 0.20 ^b
ObI1.5	473.2 ± 11.7 ^a	14.0 ± 1.2 ^{a,c}	3.09 ± 0.09 ^{a,c}	5.78 ± 0.21 ^{a,c}
ObI6	457.3 ± 9.3 ^a	12.4 ± 0.8 ^{a,b}	2.79 ± 0.13 ^a	5.17 ± 0.17 ^b
ObMI1.5	434.3 ± 9.4 ^b	8.6 ± 0.5 ^b	1.97 ± 0.08 ^b	4.10 ± 0.17 ^b
ObMI6	432.2 ± 10.0 ^b	8.8 ± 0.6 ^b	2.14 ± 0.13 ^b	4.56 ± 0.24 ^b

Примечание. АЖ – абдоминальный жир. Различия с группами C (^a), Ob (^b) и ObM (^c) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$.

Таблица 2. Уровни глюкозы до (натощак) и через 120 мин после глюкозной нагрузки, содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови и значение AUC_{0-120} для глюкозных кривых в иГТТ у крыс с ожирением и влияние на эти показатели лечения МФ и ИВИ, совместно и раздельно

Группа крыс	Глюкоза (0), ммоль/л	Глюкоза (120), ммоль/л	HbA1c, %	AUC_{0-120} , усл. ед.
C	4.2 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.30 (4.23; 4.43)	1147 ± 49
Ob	5.0 ± 0.2^a	7.1 ± 0.3^a	5.65 (5.20; 6.38) ^a	1510 ± 77^a
ObM	4.7 ± 0.2	5.6 ± 0.3^b	4.85 (4.68; 5.33) ^a	1335 ± 20
ObI1.5	4.4 ± 0.2	6.1 ± 0.4^a	5.45 (5.08; 5.95) ^a	1362 ± 82
ObI6	4.2 ± 0.1^b	5.7 ± 0.2^b	5.15 (5.00; 5.43) ^a	1334 ± 68
ObMI1.5	4.6 ± 0.2	4.9 ± 0.3^b	4.25 (4.05; 4.55)	1164 ± 33^b
ObMI6	4.4 ± 0.1	5.1 ± 0.2^b	4.90 (4.78; 5.13) ^a	1178 ± 56^b

Примечание. HbA1c – гликированный гемоглобин в крови, AUC_{0-120} – площадь под кривой «концентрация глюкозы, ммоль/л – время, мин» в иГТТ. Различия с группами C (^a) и Ob (^b) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные для всех значений, исключая содержание HbA1c, представлены как $M \pm SEM$. Значения содержания HbA1c, не удовлетворяющие нормальности распределения согласно критерию Шапиро–Уилка, представлены как медиана и межквартильный интервал (25%; 75%). Число животных в каждой группе $n = 6$.

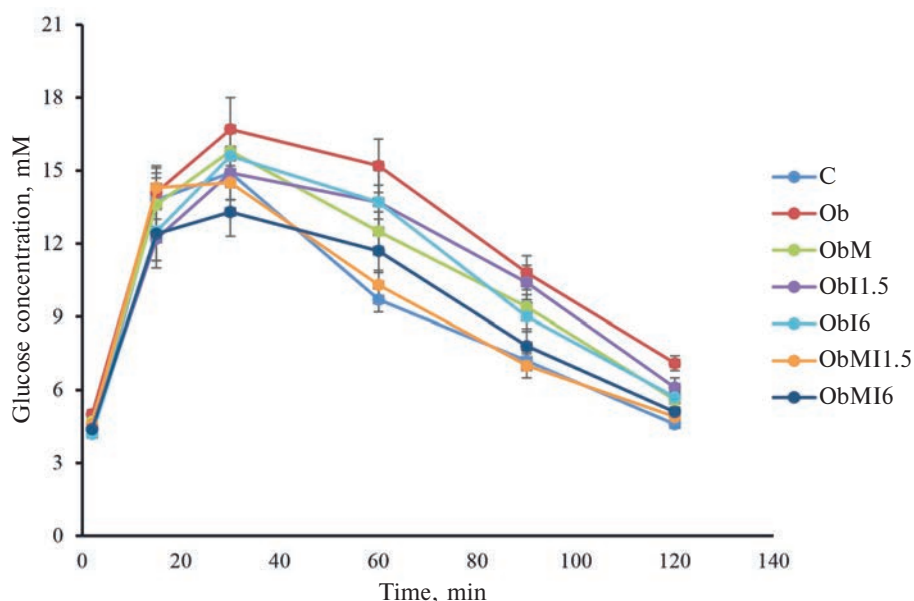


Рис. 1. Концентрация глюкозы в крови самцов крыс в течение 120 мин после нагрузки глюкозой в интраперитонеальном глюкозотолерантном тесте.

пах ObI1.5 и ObI6 показано снижение по сравнению с группой Ob стимулированных глюкозой уровней инсулина и лептина, а также значения индексов ИР-0 и ИР-120. ИВИ в группе ObI1.5 в меньшей степени влиял на базовый уровень инсулина, который значимо восстанавливался при использовании более высокой дозы гормона (табл. 3).

Таблица 3. Уровни инсулина и лептина в крови и значения индекса инсулиновой резистентности у крыс с ожирением до и через 120 мин после глюкозной нагрузки и влияние на них лечения МФ и ИВИ, совместно и раздельно

Группа крыс	Инсулин (0), нг/мл	Инсулин (120), нг/мл	ИР (0), усл. ед.	ИР (120), усл. ед.	Лептин (0), нг/мл	Лептин (120), нг/мл
С	0.78 ± 0.09	1.12 ± 0.13	3.24 ± 0.36	5.08 ± 0.50	1.16 ± 0.14	1.33 ± 0.20
Ob	1.61 ± 0.19 ^a	2.47 ± 0.16 ^a	7.94 ± 0.78 ^a	17.53 ± 1.05 ^a	3.16 ± 0.2 ^a	5.49 ± 0.62 ^a
ObM	1.15 ± 0.13	1.43 ± 0.16 ^b	5.34 ± 0.45 ^{a,b}	7.85 ± 0.36 ^{a,b}	1.83 ± 0.13 ^b	2.43 ± 0.19 ^b
ObI1.5	1.22 ± 0.10	1.77 ± 0.16 ^b	5.37 ± 0.47 ^{a,b}	10.57 ± 0.81 ^{a,b}	2.76 ± 0.24 ^{a,c}	3.95 ± 0.40 ^{a,b,c}
ObI6	0.80 ± 0.10 ^b	1.54 ± 0.15 ^b	3.32 ± 0.38 ^{b,c}	8.59 ± 0.60 ^{a,b}	2.49 ± 0.23 ^a	3.30 ± 0.25 ^{a,b}
ObMI1.5	0.99 ± 0.08 ^b	1.49 ± 0.14 ^b	4.50 ± 0.28 ^b	7.10 ± 0.49 ^b	1.51 ± 0.14 ^b	2.29 ± 0.16 ^b
ObMI6	0.68 ± 0.08 ^b	1.21 ± 0.15 ^b	2.94 ± 0.28 ^{b,c}	6.05 ± 0.56 ^b	1.83 ± 0.19 ^b	2.00 ± 0.21 ^b

Примечание. Даны концентрации инсулина и лептина в крови крыс до глюкозной нагрузки (0 мин) и через 120 мин после нее. Индекс ИР оценивали как произведение концентраций глюкозы (ммоль/л) и инсулина (нг/мл) до (базовый, ИР-0) и через 120 мин после глюкозной нагрузки (ИР-120). Различия с группами С (^a), Ob (^b) и ObM (^c) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$ – число животных в каждой группе.

В отношении нормализации уровней инсулина ИВИ был сопоставим с МФ, а при более высокой дозе ИВИ даже превосходил МФ по восстановлению индекса ИР-0. Но в отношении восстановления повышенных при ожирении уровней лептина ИВИ уступал МФ, по крайней мере при использовании дозы 1.5 МЕ/кг/сутки, на что указывает значимо более высокое значение уровней лептина в группе ObI1.5 в сравнении с группой ObM (табл. 3).

Совместное применение МФ и ИВИ с высокой эффективностью нормализовало оцениваемые метаболические и гормональные показатели, причем в ряде случаев комбинированная терапия превосходила монотерапию МФ (табл. 1–3). Так, в группе ObMI6 значение индекса ИР-0 было значимо ниже как по отношению к группе Ob, так и к группе ObM (табл. 3). Это указывает на ИВИ-опосредуемое потенцирование восстанавливающего эффекта МФ на чувствительность к инсулину, нарушенную при ожирении. Кроме того, комбинированная терапия приводила к значимому снижению показателя AUC_{0-120} для глюкозных кривых в иГТТ, что указывает на нормализацию толерантности к глюкозе. Как отмечено выше, в случае монотерапии МФ отмечали тенденцию к снижению этого показателя по сравнению с группой Ob, но различия в этом случае не были достоверными (табл. 2).

На заключительном этапе эксперимента исследовали гормональный статус тиреоидной и гонадной осей. В крови крыс с ожирением снижались уровни тиреоидных гормонов – свободного тироксина (fT4) и общего трийодтиронина (tT3), и при этом в три раза уменьшалось соотношение fT4/TTG, что указывает на развитие гипотиреоидного состояния и ослабление ответа щитовидной железы на стимулирующее воздействие ТТГ (табл. 4). Соотношение tT3/fT4 не менялось, что свидетельствует в пользу сохранения эффективности конверсии тироксина в трийодтиронин с помощью дейодиназ 1-го и 2-го типов. Лечение МФ или ИВИ в дозе 1.5 МЕ/кг/сутки частично восстанавливало уровни тиреоидных гормонов, причем в случае fT4 различия с группой Ob были значимыми, а при их комбинированном применении тиреоидный статус полностью нормализовался, а также восстанавливалась чувствительность тироцитов к ТТГ, на

что указывает значимое повышение соотношения $fT4/TTG$ в группе $ObM1.5$ (табл. 4). ИВИ в более высокой дозе, в том числе совместно с МФ, был неэффективен в отношении восстановления тиреоидного статуса и при этом значимо повышал концентрацию ТТГ в крови, в еще большей степени усугубляя резистентность тироцитов к ТТГ (табл. 4).

В группе Ob отсутствовали признаки выраженного андрогенного дефицита, так как уровни тестостерона, ЛГ и соотношение тестостерон/ЛГ в крови значимо от контрольной группы не отличались (табл. 5). Лечение МФ, в том числе совместно с ИВИ, значимого влияния на гонадную ось не оказывало.

Таблица 4. Уровни ТТГ, тиреоидных гормонов ($fT4$, $tT3$) и рассчитанные соотношения $fT4/TTG$ и $tT3/fT4$ у самцов крыс с ожирением и влияние лечения МФ, ИВИ и их комбинацией

Группа крыс	ТТГ, мкЕД/мл	$fT4$, пмоль/л	$tT3$, нмоль/л	$fT4/TTG$, усл. ед.	$tT3/fT4$, усл. ед.
С	0.38 (0.32; 0.61)	26.8 ± 1.1	2.24 ± 0.10	65.9 ± 7.5	83.6 ± 1.3
Ob	0.89 (0.65; 1.12)	17.2 ± 0.6^a	1.57 ± 0.11^a	20.9 ± 2.8^a	91.0 ± 3.9
ObM	0.76 (0.60; 0.98)	22.6 ± 1.4^b	1.96 ± 0.09	31.9 ± 5.2^a	87.7 ± 3.9
$ObI1.5$	0.84 (0.67; 1.20)	24.6 ± 1.1^b	1.99 ± 0.08	29.5 ± 4.3^a	81.6 ± 3.8
$ObI6$	1.20 (0.95; 1.48) ^a	20.9 ± 1.2^a	1.63 ± 0.09^a	18.4 ± 2.6^a	78.7 ± 4.1
$ObMI1.5$	0.68 (0.56; 0.87)	$29.6 \pm 1.0^{b,c}$	$2.50 \pm 0.15^{b,c}$	$44.2 \pm 5.3^{a,b}$	84.3 ± 2.9
$ObMI6$	1.51 (1.10; 1.98) ^a	19.3 ± 1.5^a	1.72 ± 0.15^a	14.2 ± 2.8^a	89.0 ± 2.0

Примечание. Соотношения $fT4/TTG$ и $tT3/fT4$ рассчитывали как соотношения концентраций тиреоидных гормонов ($fT4$ – пмоль/л; $tT3$ – нмоль/л) к концентрации ТТГ (мкЕД/мл), представляя их в условных единицах. Различия с группами С (^a), Ob (^b) и ObM (^c) статистически значимы при $p < 0.05$. Данные для всех значений, исключая концентрацию ТТГ, представлены как $M \pm SEM$. Значения концентрации ТТГ, не удовлетворяющие нормальности распределения согласно критерию Шапиро–Уилка, представлены как медиана и межквартильный интервал (25%; 75%). Число животных в каждой группе $n = 6$.

Таблица 5. Уровни ЛГ, тестостерона и их соотношения у самцов крыс с ожирением и влияние на них лечения МФ и ИВИ, совместно или раздельно

Группа крыс	ЛГ, нг/мл	Тестостерон (11-00), нмоль/л	Тестостерон (14-00), нмоль/л	Тестостерон (11-00)/ЛГ, усл. ед.
С	1.89 ± 0.20	17.3 ± 1.4	16.2 ± 1.4	9.7 ± 1.2
Ob	2.51 ± 0.18	12.6 ± 1.2	11.5 ± 1.1	5.3 ± 0.9
ObM	1.85 ± 0.18	17.4 ± 1.4	17.6 ± 2.2	10.2 ± 1.8
$ObI1.5$	2.43 ± 0.17	14.4 ± 1.2	14.3 ± 1.4	6.2 ± 0.9
$ObI6$	2.16 ± 0.22	14.9 ± 1.4	14.6 ± 1.5	7.7 ± 1.6
$ObMI1.5$	1.99 ± 0.18	16.5 ± 2.0	17.0 ± 1.7	9.1 ± 1.8
$ObMI6$	2.33 ± 0.18	16.7 ± 1.8	15.3 ± 1.6	7.7 ± 1.4

Примечание. Данные представлены как $M \pm SEM$, $n = 6$ в каждой группе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

МФ является препаратом первой линии при лечении СД2 и МС, а также широко применяется для коррекции метаболических и гормональных нарушений при ожирении. Однако его применение ограничено тем, что часть пациентов имеют низкую к нему чувствительность, а у части пациентов, особенно при длительном использовании сравнительно высоких доз препарата, развиваются серьезные побочные явления, требующие замены МФ другими препаратами, которые очень часто оказываются малоэффективными [8–13]. В связи с этим перспективным направлением является комбинированное применение МФ с другими препаратами, способными потенцировать действие МФ, что позволяет снизить эффективные дозы МФ и повысить чувствительность к нему у резистентных к МФ пациентов. Нами ранее была показана эффективность комбинированного применения МФ с ИВИ при экспериментальном СД2 с ожирением, которая по ряду показателей превосходила монотерапию МФ [23]. Настоящее исследование показало, что такая комбинация эффективна и при коррекции метаболических и некоторых гормональных нарушений у самцов крыс с ДИО, вызванным «кафетерий-диетой».

Нами установлено, что комбинация сравнительно низкой (для крыс) суточной дозы МФ 100 мг/кг с ИВИ не только приводила к значимому снижению массы тела и жировой ткани, восстановлению глюкозного гомеостаза, нормализации уровней инсулина и лептина, показателей липидного обмена и тиреоидного статуса у крыс с ДИО, но и по некоторым показателям значимо превосходила терапию МФ. В сравнении с монотерапией МФ комбинированная терапия отчетливо нормализовала толерантность к глюкозе, на что указывает сходство значений AUC_{0-120} в контрольной группе и в группах с обработкой совместно МФ и ИВИ (табл. 2, рис. 1). Индекс ИР-0, иллюстрирующий чувствительность тканей к инсулину в условиях отсутствия пищевых стимулов (включая глюкозную нагрузку), в группе ОбМІ6 был значимо ниже, чем в группе ОбМ, и не превосходил его значения в контроле. Это свидетельствует о полноценном восстановлении чувствительности к инсулину в условиях комбинированной терапии, что хорошо согласуется с нормализацией глюкозного гомеостаза у крыс группы ОбМІ6. Необходимо отметить, что эффективность восстановления чувствительности к инсулину в группе ОбМІ1.5 была сопоставимой с таковой в группе ОбМІ6.

Вызываемое ИВИ потенцирование восстанавливающего эффекта МФ на чувствительность тканей к инсулину обусловлено тем, что оба препарата положительно воздействуют на активность в них инсулиновой системы по различным механизмам. МФ, восстанавливая нарушенный в условиях метаболических расстройств энергетический статус клеток путем нормализации активности в них АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК), подавляет процессы воспаления, апоптоза, снижает продукцию активных форм кислорода и азота, нормализует продукцию эндогенной глюкозы и липидный обмен, и это непосредственно влияет на функциональную активность инсулиновой системы в мышцах, жировой ткани и других тканях, включая мозг [30]. В свою очередь ИВИ усиливает центральную регуляцию энергетического обмена, ослабляя глюконеогенез в печени, что приводит к улучшению глюкозного гомеостаза, а также модулирует сигнальные пути в гипоталамусе и других отделах мозга, контролируемые анорексигенными и орексигенными факторами, что приводит к снижению аппетита и массы тела и улучшает нарушенный при ожирении энергетический баланс [31–33]. Следует, однако, отметить, что эффективность ИВИ в отношении нормализации метаболических показателей и чувствительности к инсулину в значительной степени определяется характером метаболических нарушений, выраженностью ИР и гендерными особенностями [33–35]. Важную роль играет способность ИВИ потенцировать сигнальные пути лептина в ЦНС, которые во многом синергичны таковым у инсулина [36]. Поскольку лептин является основным эндогенным регулятором АМРК, то это вносит

определенный вклад в нормализацию всей интегративной сети сигнальных каскадов мозга и в центральную регуляцию периферического метаболизма и инсулиновой чувствительности [32, 36]. ИВИ способен положительно влиять на показатели липидного обмена, нарушенные при ожирении, но действие его, как и в случае АМРК, является опосредованным [37]. В этой связи необходимо отметить, что коррекция дислипидемии МФ, реализуемая через системное восстановление энергетического обмена в адипоцитах, вносит значимый вклад в восстановление чувствительности к инсулину при СД2 и ожирении [38, 39].

Ожирение и МС часто ассоциированы с заболеваниями щитовидной железы, причем метаболические расстройства могут быть как следствием, так и причиной таких заболеваний. В условиях ожирения, МС и СД2 с высокой частотой развиваются различные формы гипотиреоза, которые характеризуются сниженным метаболизмом, обуславливающим накопление жировой массы, нарушения липидного и углеводного обмена [40]. Неудивительно, что МФ терапия способна существенно улучшать функции тиреоидной системы при этих метаболических расстройствах, но в последние годы превалирует точка зрения о том, что МФ положительно воздействует на функции щитовидной железы не только опосредованно, но и непосредственно влияя на компоненты гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси [41, 42]. Кроме того, МФ способствует ослаблению последствий аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, включая аутоиммунный субклинический тиреоидит [41, 43] и офтальмопатию Грейвса, ассоциированную с аутоиммунным гипертиреозом [44].

Нами показано, что МФ терапия частично восстанавливала гормональные показатели тиреоидной оси у крыс с ожирением, в то время как комбинация МФ и сравнительно низкой дозы ИВИ (1.5 МЕ/кг) восстанавливала их полностью (табл. 4). При этом обнаружено отчетливо выраженное негативное влияние комбинации МФ с более высокой дозой ИВИ на тиреоидную ось крыс с ожирением, что выражалось в значимом повышении в сравнении с контролем уровня ТТГ в крови, а также в сохранении сниженных значений тиреоидных гормонов и соотношения fT4/ТТГ. Одной из причин этого может быть стимулирующее влияние ИВИ на продукцию ТТГ, что было показано нами ранее при исследовании длительного влияния сравнительно высоких доз ИВИ на компоненты тиреоидной системы у самцов крыс со среднетяжелой формой сахарного диабета 1-го типа, сопровождающегося выраженным дефицитом тиреоидных гормонов [26]. Нами был сделан вывод о том, что длительное лечение высокими дозами ИВИ несет риски развития гипотиреоза, вызванного повышенной активностью тиреотрофов и увеличением уровня ТТГ в крови, приводящего к резистентности тироцитов к стимулирующему действию ТТГ. Этот вывод получил новые подтверждения в рамках настоящего исследования, демонстрируя сильно выраженную зависимость влияния ИВИ на функциональную активность тиреоидной системы при различных дозах ИВИ.

Следует также отметить, что терапия МФ и его комбинацией с ИВИ на изученной нами экспериментальной модели ожирения не влияла на гормональный статус гонадной оси у самцов крыс, что обусловлено отсутствием выраженного андрогенного дефицита у крыс с ожирением, вызванным «кафетерий-диетой». При этом в литературе имеются многочисленные данные о положительном влиянии МФ на андрогенный статус, сперматогенез и фертильность при метаболических расстройствах, а также о механизмах этого влияния, включающего как улучшение центральной регуляции гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, так и восстановление энергетического статуса клеток репродуктивной системы как по зависимым, так и по независимым от АМРК механизмам [45].

Таким образом, впервые показано, что трехнедельное лечение комбинацией МФ и ИВИ нормализует массу тела и абдоминального жира, восстанавливает метаболические и гормональные показатели у крыс с ожирением, вызванным «кафетерий-диетой»,

включающей легкие углеводы и насыщенные жиры. В сравнении с монотерапией МФ, его комбинация с ИВИ с более высокой эффективностью восстанавливала чувствительность к инсулину, оцениваемую по снижению индекса ИР, а также нормализовала толерантность к глюкозе, оцениваемую по снижению значения AUC_{0-120} для глюкозных кривых в иГТТ. При этом комбинация МФ с ИВИ, взятым в более низкой дозе (1.5 МЕ/кг), полностью восстанавливала гормональный статус тиреоидной системы, в то время как при использовании совместно с МФ сравнительно высокой дозы ИВИ (6 МЕ/кг) отмечали усугубление гипотиреоидного состояния в основном вследствие гиперактивации секреции ТТГ и развития резистентности тироцитов к этому гормону. Тем самым для коррекции метаболических и гормональных показателей при ДИО, в том числе для восстановления функций тиреоидной системы, перспективным является совместное применение МФ и сравнительно низких доз ИВИ, не оказывающих негативного влияния на тиреоидную ось.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А. О. Ш., К. В. Д.), сбор и обработка данных (И. И. З., К. В. Д.), написание и редактирование манускрипта (А. О. Ш., К. В. Д.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2022-296), на создание и развитие научного центра мирового уровня «Павловский центр «Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости». Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, протокол заседания № 2-2/2023 от 28.02.2023 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *GBD 2017 Risk Factor Collaborators* (2018) Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392(10159): 1923–1994.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32225-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32225-6)
2. *Frühbeck G, Toplak H, Woodward E, Yumuk V, Maislos M, Oppert JM; Executive Committee of the European Association for the Study of Obesity* (2013) Obesity: the gateway to ill health – an EASO position statement on a rising public health, clinical and scientific challenge in Europe. *Obes Facts* 6(2): 117–120.
<https://doi.org/10.1159/000350627>
3. *Dutta S, Shah RB, Singhal S, Dutta SB, Bansal S, Sinha S, Haque M* (2023) Metformin: A Review of Potential Mechanism and Therapeutic Utility Beyond Diabetes. *Drug Des Devel Ther* 17: 1907–1932.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S409373>
4. *Hundal RS, Inzucchi SE* (2003) Metformin: new understandings, new uses. *Drugs* 63(18): 1879–1894.
<https://doi.org/10.2165/00003495-200363180-00001>

5. *Alshahrani A, Aljada A, Masood A, Mujammami M, Alfadda AA, Musambil M, Alanazi IO, AlDubayee M, Abdel Rahman AM, Benabdelkamel H* (2023) Proteomic Profiling Identifies Distinct Regulation of Proteins in Obese Diabetic Patients Treated with Metformin. *Pharmaceutics* (Basel) 16(10): 1345.
<https://doi.org/10.3390/ph16101345>
6. *Franks S* (2011) When should an insulin sensitizing agent be used in the treatment of polycystic ovary syndrome? *Clin Endocrinol (Oxf)* 74(2): 148–151.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2010.03934.x>
7. *Condorelli RA, Cannarella R, Aversa A, Basile L, Avola O, Calogero AE, La Vignera S* (2022) Effects of Slow-Acting Metformin Treatment on the Hormonal and Morphological Thyroid Profile in Patients with Insulin Resistance. *Pharmaceutics* 14(10): 1987.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14101987>
8. *Van Leeuwen N, Nijpels G, Becker ML, Deshmukh H, Zhou K, Stricker BH, Uitterlinden AG, Hofman A, van 't Riet E, Palmer CN, Guigas B, Slagboom PE, Durrington P, Calle RA, Neil A, Hitman G, Livingstone SJ, Colhoun H, Holman RR, McCarthy MI, Dekker JM, 't Hart LM, Pearson ER* (2012) A gene variant near ATM is significantly associated with metformin treatment response in type 2 diabetes: a replication and meta-analysis of five cohorts. *Diabetologia* 55(7): 1971–1977.
<https://doi.org/10.1007/s00125-012-2537-x>
9. *Chen P, Cao Y, Chen S, Liu Z, Chen S, Guo Y* (2022) Association of *SLC22A1*, *SLC22A2*, *SLC47A1*, and *SLC47A2* Polymorphisms with Metformin Efficacy in Type 2 Diabetic Patients. *Biomedicines* 10(10): 2546.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10102546>
10. *Peng A, Gong C, Xu Y, Liang X, Chen X, Hong W, Yan J* (2023) Association between organic cation transporter genetic polymorphisms and metformin response and intolerance in T2DM individuals: a systematic review and meta-analysis. *Front Public Health* 11: 1183879.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1183879>
11. *Kanto K, Ito H, Noso S, Babaya N, Hiromine Y, Taketomo Y, Toma J, Niwano F, Yasutake S, Kawabata Y, Ikegami H* (2017) Effects of dosage and dosing frequency on the efficacy and safety of high-dose metformin in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Invest* 9(3): 587–593.
<https://doi.org/10.1111/jdi.12755>
12. *DeFronzo R, Fleming GA, Chen K, Bicsak TA* (2016) Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. *Metabolism* 65(2): 20–29.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.014>
13. *Nabrdalik K, Skonieczna-Żydecka K, Irlík K, Hendel M, Kwiendacz H, Łoniewski I, Januszkiewicz K, Gumprecht J, Lip GYH* (2022) Gastrointestinal adverse events of metformin treatment in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review, meta-analysis and meta-regression of randomized controlled trials. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 975912.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.975912>
14. *Ji L, Han P, Wang X, Liu J, Zheng S, Jou YM, O'Neill EA, Golm GT, Engel SS, Kaufman KD, Shankar RR* (2016) Randomized clinical trial of the safety and efficacy of sitagliptin and metformin co-administered to Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Invest* 7(5): 727–736.
<https://doi.org/10.1111/jdi.12511>
15. *Shaaban HH, Alzaim I, El-Mallah A, Aly RG, El-Yazbi AF, Wahid A* (2022) Metformin, pioglitazone, dapagliflozin and their combinations ameliorate manifestations associated with NAFLD in rats via anti-inflammatory, anti-fibrotic, anti-oxidant and anti-apoptotic mechanisms. *Life Sci* 308: 120956.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120956>
16. *Derkach KV, Ivantsov AO, Chistyakova OV, Sukhov IB, Buzanakov DM, Kulikova AA, Shpakov AO* (2017) Intranasal insulin restores metabolic parameters and insulin sensitivity in rats with metabolic syndrome. *Bull Exp Biol Med* 163(2): 184–189.
<https://doi.org/10.1007/s10517-017-3762-6>
17. *Шпаков АО, Деркач КВ, Суркова ЕВ, Беспалов АИ* (2019) Перспективы применения интраназально вводимого инсулина для коррекции метаболических и гормональных нарушений при сахарном диабете и метаболическом синдроме. *Пробл эндокринологии* 65(5): 389–395. [*Shpakov AO, Derkach KV, Surkova EV, Bepalov AI* (2019) Prospects for the use of intranasally administered insulin for the correction of metabolic and hormonal disorders in diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Probl endokrinol* 65(5): 389–395. (In Russ)].
<https://doi.org/10.14341/probl9960>
18. *Деркач КВ, Бондарева ВМ, Шпаков АО* (2022) Влияние интраназально вводимого инсулина на метаболические и гормональные показатели у взрослых самцов крыс, нарушен-

- ные вследствие трехдневного голодания в раннем постнатальном периоде. Биомед химия 68(4): 263–271. [Derkach KV, Bondareva VM, Shpakov AO (2022) The effect of intranasally administered insulin on metabolic and hormonal parameters in adult male rats, impaired due to three-day fasting in the early postnatal period. Biomed khimiya 68(4): 263–271. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18097/PBMC20226804263>
19. Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. Future Sci OA 1(3): FSO25. <https://doi.org/10.4155/fso.15.23>
 20. Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtuykov A, Romanova I, Bayunova L, Shpakov A (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. PLoS One 14(3): e0213779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>
 21. Derkach KV, Bondareva VM, Shpakov AO (2018) Coadministration of intranasally delivered insulin and proinsulin C-peptide to rats with the types 1 and 2 diabetes mellitus restores their metabolic parameters. Advances Gerontol 8(2): 139–146. <https://doi.org/10.1134/S2079057018020030>
 22. Derkach KV, Bondareva VM, Shpakov AO (2019) Regulatory effects of intranasal C-peptide and insulin on thyroid and androgenic status of male rats with moderate type 1 diabetes mellitus. J Evol Biochem Physiol 55(6): 493–496. <https://doi.org/10.1134/S0022093019060073>
 23. Деркач КВ, Бондарева ВМ, Басова НЕ, Кузнецова ЛА, Шпаков АО (2021) Совместное применение метформина и интраназального инсулина нормализует чувствительность к глюкозе и гормональный статус у крыс с диабетом 2-го типа. Интегра́т физиол 2(4): 399–411. [Derkach KV, Bondareva VM, Basova NE, Kuznetsova LA, Shpakov AO (2021) Combined use of metformin and intranasal insulin normalizes glucose sensitivity and hormonal status in rats with type 2 diabetes. Integrat Physiol 2(4): 399–411. (In Russ)]. <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-4-399-411>
 24. Oche J, Olorundare O, Afolabi S, Ologe M, Njan A, Akanbi O (2023) Comparative Therapeutic Effect of Single/Combined Administration of Saxagliptin, Metformin and Intranasal Insulin on Dexamethasone Induced Insulin Resistance in Albino Wistar Rat Model. Niger J Physiol Sci 38(1): 37–46. <https://doi.org/10.54548/njps.v38i1.7>
 25. Sukhov IB, Lebedeva MF, Zakharova IO, Derkach KV, Bayunova LV, Zorina II, Avrova NF, Shpakov AO (2020) Intranasal Administration of Insulin and Gangliosides Improves Spatial Memory in Rats with Neonatal Type 2 Diabetes Mellitus. Bull Exp Biol Med 168(3): 317–320. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04699-8>
 26. Derkach KV, Bogush IV, Berstein LM, Shpakov AO (2015) The Influence of Intranasal Insulin on Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in Normal and Diabetic Rats. Horm Metab Res 47(12): 916–924. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1547236>
 27. Njan AA, Fatigun CO, Alli-Oluwafuyi AM, Olorundare OE, Afolabi OS, Akinola O, Amin A (2018) Effect of intranasal insulin on peripheral glucose profile in dexamethasone-induced insulin resistance in Wistar rats. Beni-Suef University J Basic Appl Sci 7(4): 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.06.003>
 28. Nijssen KMR, Mensink RP, Joris PJ (2023) Effects of Intranasal Insulin Administration on Cerebral Blood Flow and Cognitive Performance in Adults: A Systematic Review of Randomized, Placebo-Controlled Intervention Studies. Neuroendocrinology 113(1): 1–13. <https://doi.org/10.1159/000526717>
 29. Bakhtuykov AA, Derkach KV, Sorokoumov VN, Stepochkina AM, Romanova IV, Morina IY, Zakharova IO, Bayunova LV, Shpakov AO (2021) The Effects of Separate and Combined Treatment of Male Rats with Type 2 Diabetes with Metformin and Orthosteric and Allosteric Agonists of Luteinizing Hormone Receptor on Steroidogenesis and Spermatogenesis. Int J Mol Sci 23(1): 198. <https://doi.org/10.3390/ijms23010198>
 30. He L (2020) Metformin and Systemic Metabolism. Trends Pharmacol Sci 41(11): 868–881. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.09.001>
 31. Dash S, Xiao C, Morgantini C, Koulajian K, Lewis GF (2015) Intranasal insulin suppresses endogenous glucose production in humans compared with placebo in the presence of similar venous insulin concentrations. Diabetes 64(3): 766–774. <https://doi.org/10.2337/db14-0685>

32. *Beddows CA, Dodd GT* (2021) Insulin on the brain: The role of central insulin signalling in energy and glucose homeostasis. *J Neuroendocrinol* 33(4): e12947.
<https://doi.org/10.1111/jne.12947>
33. *Scherer T, Sakamoto K, Buettner C* (2021) Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nat Rev Endocrinol* 17(8): 468–483.
<https://doi.org/10.1038/s41574-021-00498-x>
34. *Heni M, Wagner R, Kullmann S, Gancheva S, Roden M, Peter A, Stefan N, Preissl H, Häring HU, Fritsche A* (2017) Hypothalamic and Striatal Insulin Action Suppresses Endogenous Glucose Production and May Stimulate Glucose Uptake During Hyperinsulinemia in Lean but Not in Overweight Men. *Diabetes* 66(7): 1797–1806.
<https://doi.org/10.2337/db16-1380>
35. *Hummel J, Benkendorf C, Fritsche L, Prystupa K, Vosseler A, Gancheva S, Trenkamp S, Birkenfeld AL, Preissl H, Roden M, Häring HU, Fritsche A, Peter A, Wagner R, Kullmann S, Heni M* (2023) Brain insulin action on peripheral insulin sensitivity in women depends on menstrual cycle phase. *Nat Metab* 5(9): 1475–1482.
<https://doi.org/10.1038/s42255-023-00869-w>
36. *Fujikawa T* (2021) Central regulation of glucose metabolism in an insulin-dependent and -independent manner. *J Neuroendocrinol* 33(4): e12941.
<https://doi.org/10.1111/jne.12941>
37. *Xiao C, Dash S, Stahel P, Lewis GF* (2017) Effects of Intranasal Insulin on Triglyceride-Rich Lipoprotein Particle Production in Healthy Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37(9): 1776–1781.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309705>
38. *Khan S, Jena G* (2016) Sodium butyrate reduces insulin-resistance, fat accumulation and dyslipidemia in type-2 diabetic rat: A comparative study with metformin. *Chem Biol Interact* 254: 124–134.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.007>
39. *Min QQ, Qin LQ, Sun LZ, Zuo WT, Zhao L, Xu JY* (2018) Effects of Metformin Combined with Lactoferrin on Lipid Accumulation and Metabolism in Mice Fed with High-Fat Diet. *Nutrients* 10(11): 1628.
<https://doi.org/10.3390/nu10111628>
40. *Biondi B* (2023) Subclinical Hypothyroidism in Patients with Obesity and Metabolic Syndrome: A Narrative Review. *Nutrients* 16(1): 87.
<https://doi.org/10.3390/nu16010087>
41. *Meng X, Xu S, Chen G, Derwahl M, Liu C* (2017) Metformin and thyroid disease. *J Endocrinol* 233(1): R43–R51.
<https://doi.org/10.1530/JOE-16-0450>
42. *Krysiak R, Kowalcze K, Okopień B* (2020) Different effects of metformin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis activity in levothyroxine-treated and levothyroxine-naïve women with non-autoimmune hypothyroidism. *J Clin Pharm Ther* 45(6): 1427–1433.
<https://doi.org/10.1111/jcpt.13247>
43. *Krysiak R, Kowalcze K, Okopień B* (2022) Thyroid Antibody Titers and Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis Activity in Levothyroxine-Treated Women With Autoimmune Subclinical Hypothyroidism Receiving Atorvastatin or Metformin. *J Clin Pharmacol* 62(12): 1566–1573.
<https://doi.org/10.1002/jcph.2123>
44. *Xu Z, Ye H, Xiao W, Sun A, Yang S, Zhang T, Sha X, Yang H* (2022) Metformin Attenuates Inflammation and Fibrosis in Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Int J Mol Sci* 23(24): 15508.
<https://doi.org/10.3390/ijms232415508>
45. *Shpakov AO* (2021) Improvement Effect of Metformin on Female and Male Reproduction in Endocrine Pathologies and Its Mechanisms. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(1): 42.
<https://doi.org/10.3390/ph14010042>

Effectiveness of Course Use of Metformin and its Combination with Intranasal Insulin for Treatment of Rats with “Cafeteria Diet”-Induced Obesity

K. V. Derkach^{a,*}, I. I. Zorina^a, and A. O. Shpakov^{a,b}

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

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

*e-mail: derkach_k@list.ru

The “cafeteria diet,” which includes an excess of saturated fats and easily digestible carbohydrates, leads to obesity and is a risk factor for the development of type 2 diabetes. Metformin (MF) is often used to correct diet-induced obesity (DIO), but in some patients it causes serious side effects, which requires a reduction in its doses, including through combined use with drugs that potentiate the effects of MF. A candidate for the role of such drugs is intranasally administered insulin (INI), which itself has a restorative potential in the treatment of metabolic disorders. The goal of the work was to study the effectiveness of a three-week combined use of MF (100 mg/kg/day, perorally) with INI in two doses (1.5 and 6.0 IU/kg/day) for the correction of metabolic and hormonal disorders in male rats with DIO induced by a “cafeteria diet”. It was shown that in rats with DIO, the combination of MF and INI normalized body weight and abdominal fat, restored glucose homeostasis, lipid metabolism, basal and glucose-stimulated levels of insulin and leptin. Compared with MF monotherapy, the combined use of MF and INI more effectively restored sensitivity to insulin, assessed by a decrease in the insulin resistance index, and also normalized glucose tolerance, assessed by a decrease in the value of AUC_{0-120} , the integrated area under glucose concentration curves in the glucose tolerance test. The combination of MF with INI at a dose of 1.5 IU/kg/day normalized the hormonal status of the thyroid system, disturbed in DIO, while the combination of MF with INI at a dose of 6 IU/kg/day worsened the hypothyroid state, mainly due to hyperactivation of thyroid-stimulating hormone secretion and the development resistance of the thyroid gland to it. Thus, for the correction of metabolic and hormonal parameters in DIO, including the restoration of the functions of the thyroid system, the use of MF with relatively low doses of INI, which does not have a negative effect on the thyroid axis, is promising.

Keywords: metformin, intranasal insulin, obesity, high-calorie diet, insulin resistance, hyperleptinemia, thyroid hormone, thyroid-stimulating hormone, male rats, endocrine system

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ОСОБЕННОСТИ ОТРАЖЕНИЯ ЭМОЦИЙ В ХАРАКТЕРИСТИКАХ РЕЧИ
И МИМИКЕ ДЕТЕЙ 7–8 ЛЕТ

© 2024 г. Е. А. Клешнев^{1,*}, О. В. Фролова¹, Е. Е. Ляксо^{1,**}

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* E-mail: kleshnev.egor@gmail.com

**E-mail: lyakso@gmail.com

Поступила в редакцию 21.07.2023 г.

После доработки 18.01.2024 г.

Принята к публикации 05.02.2024 г.

Целью исследования явилось изучение особенностей отражения эмоциональных состояний «нейтральное (спокойное состояние) – печаль – радость – гнев – страх» в речи и мимике детей 7–8 лет и выявление различий в проявлении эмоций мальчиками и девочками данного возраста. Работа выполнена в рамках исследования эмоциональной сферы детей с типичным и атипичным развитием с использованием методики оценки эмоционального развития детей CEDM. В исследовании приняли участие 14 детей (7 мальчиков, 7 девочек) – учеников общеобразовательной школы. Проанализирована способность детей к отражению эмоций в характеристиках голоса и мимики и распознаванию эмоций. С этой целью проведена запись речи и видеозапись мимики и поведения детей, инструментальный и перцептивный анализ эмоциональной речи, автоматический анализ мимической экспрессии. Регистрировали частоту сердечных сокращений детей, определяли ведущее полушарие по речи с использованием дихотического теста. Выявлены особенности отражения эмоциональных состояний мальчиков и девочек в характеристиках речи. Описана специфика отражения эмоциональных состояний детей в мимической экспрессии. Определены связи между психофизиологическими показателями детей и отражением ими эмоциональных состояний в голосе и мимике.

Ключевые слова: эмоции, эмоциональная речь, акустические характеристики, отражение эмоций, школьный возраст, детская речь

DOI: 10.31857/S0869813924040077, EDN: CNMFCD

ВВЕДЕНИЕ

Эмоции являются одним из факторов организации адаптивного поведения и отражают функциональное состояние организма. Эмоциональное состояние проявляется в характеристиках голоса, особенностях речи, в невербальном поведении (мимике, пантомимике и т. д.) и в вегетативных компонентах поведенческих реакций [1]. Эмоциональная сфера человека зависит от его возраста, особенностей воспитания и культурной среды [2, 3]. Детям младшего школьного возраста присущ переходный вариант развития эмоций – между спонтанным проявлением, характерным для раннего возраста, и формированием контролируемого поведения, обусловленного включением в новую среду – школу. Эти изменения связаны, с одной стороны, с социальными факторами, с другой – с прогрессивным изменением морфофункциональной организации проек-

ционных и ассоциативных областей коры головного мозга [4, 5]. Школьное обучение подразумевает формирование новых социальных отношений между ребенком и учителем, ребенком и сверстниками. Новый опыт оказывает влияние на выражение эмоциональных состояний, возрастают социальные конфликты, вызывающие негативные эмоции [6]. На протяжении учебы в младшей школе дети больше узнают о социально приемлемых правилах выражения эмоций, обучаясь тому, какие эмоции демонстрировать (а какие подавлять) в специфических социальных ситуациях [7–10].

Префронтальная кора, осуществляющая нисходящий контроль эмоциональных реакций, возникающих в лимбической системе, не достигает необходимого уровня развития к началу школьного обучения ребенка [11, 12]. В исследованиях с использованием современных методов нейровизуализации [13] показано, что возрастные изменения миндалевидного тела, гиппокампа, лобной, теменной областей коры, височной доли правого и левого полушария нелинейны и зависят от пола ребенка.

Большое количество работ посвящено изучению восприятия детьми эмоций при предъявлении визуальных (мимическая экспрессия) и речевых стимулов в норме [7, 14–20] и при нарушениях развития различной этиологии [21–26]. Данные об особенностях проявления эмоций у детей получены главным образом на основании опросников и шкал наблюдения за поведением ребенка [27], оценки мимической экспрессии [28, 29]. В этих работах не выявлена строгая зависимость между полом ребенка и успешностью распознавания им эмоций других людей. Анализ данных 166 работ [30] показал межполовые различия в проявлении эмоций. Показано, что девочки демонстрируют больше положительных эмоций, чем мальчики, мальчики чаще, чем девочки, демонстрируют гнев.

Меньшее число работ посвящено изучению эмоциональной детской речи и распознаванию эмоциональных состояний детей по их речи взрослыми [31]. В немногочисленных работах используется инструментальный анализ эмоциональной детской речи [1, 31, 32]. Показано, что распознавание эмоционального состояния детей по их речи взрослыми зависит от возраста детей, их психоневрологического состояния [33]. Атипичное развитие детей может сопровождаться нарушениями эмоциональной сферы – отражения эмоций в голосе и мимике [25, 34–37].

Для анализа эмоциональной сферы детей с типичным и атипичным развитием в рамках международного исследования разработана методика – Child Emotion Development Method – CEDM [38], включающая тестовые задания на отражение и распознавание эмоциональных состояний. Определены тестовые задания (краткая версия – CEDM-sh), которые способны выполнять дети с типичным и атипичным развитием [38]. Данная работа является частью общего исследования по изучению эмоциональной сферы детей и выполнена с использованием тестовых заданий CEDM-sh для дальнейшего сопоставления результатов с данными, полученными для детей с атипичным развитием.

Цель настоящего исследования – определение особенностей отражения эмоций в речи и мимике детей 7–8 лет, воспитывающихся в русскоязычной среде, выявление различий в проявлении эмоций мальчиками и девочками данного возраста.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие 14 детей (7 мальчиков, 7 девочек) в возрасте 7–8 лет (7.3 ± 0.6 лет), учащиеся общеобразовательной школы г. Санкт-Петербурга, для которых русский язык является родным. По заключению педиатра, все дети развивались в соответствии с возрастными нормами. Критериями включения детей в исследование явились:

- 1) подписание родителями информированного согласия на участие ребенка в исследовании, одобренного Этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного университета;

- 2) возраст детей 7–8 лет, посещение общеобразовательной школы;
- 3) отсутствие нарушений зрения и слуха.

Исследование проведено в условиях общеобразовательной школы г. Санкт-Петербурга с использованием методики «Child Emotion Development Method» (CEDM-sh) [38].

Процедура исследования

В рамках настоящего исследования детям было предложено выполнение заданий на:

- 1) отражение эмоциональных состояний (диалог экспериментатора с ребенком, «актерская» речь – задания ребенку продемонстрировать эмоции в голосе);
- 2) распознавание эмоциональных состояний детьми по видеотесту.

Исследование включало аудиозапись речи и видеозапись поведения детей в модельных ситуациях; определение психофизиологических характеристик ребенка: частоты сердечных сокращений (ЧСС) и ведущего полушария по слуху и речи методом дихотического прослушивания; анализ речи детей с использованием перцептивного исследования и инструментального анализа; анализ мимической экспрессии детей в ситуации диалога.

Использовали стандартизированный протокол записи [38], который включал:

1. Диалог экспериментатора с ребенком, в процессе которого экспериментатор задавал стандартный набор вопросов о школе, любимых занятиях, увлечениях, друзьях. Задаваемые ребенку вопросы направлены на вызов у него разных эмоциональных состояний [39].

2. Задание на изображение ребенком эмоциональных состояний в голосе – «актерская» речь. Данный подход был апробирован ранее для детей разных возрастных групп [39].

«Актёрская» речь – задание, в котором ребенка просили изобразить голосом пять эмоциональных состояний (нейтральное – печаль – радость – гнев – страх). Дети читали, а затем произносили слова и фразы, изображая голосом каждую из заданных эмоций. Задание включало произнесение слов и фраз, имеющих заданную эмоциональную окраску, и текстов бессмыслиц [38]. Тексты бессмыслицы – это семантически бессмысленные предложения, похожие на настоящие предложения, которые широко используют в исследованиях, направленных на отражение эмоциональных состояний в характеристиках голоса без опоры на лингвистический контекст [39–41].

В качестве речевого материала использовали:

1. Слова, отражающие каждое из пяти предложенных эмоциональных состояний, например:

крушить, бить, толкнуть – отражающие состояние гнева;
классно, красиво, круто, супер – отражающие состояние радости;
нормально, ну, и, три – отражающие нейтральное состояние;
грустно, тоскливо, печально – отражающие состояние печали;
страшно, ужасно, ужас, жуть – отражающие состояние страха.

2. Фразы, например:

на улице идет дождь, мне грустно, печальная пора – демонстрируют состояние печали;

я смотрел страшный мультик, на улице темно, мне страшно, хочу забиться под одеяло от ужаса – демонстрируют состояние страха;

я люблю все бить и ломать, когда меня все достали, меня все раздражает – демонстрируют состояние гнева;

у меня все нормально – демонстрирует нейтральное состояние;

я люблю, когда все красиво! – демонстрирует состояние радости.

Произнесение эмоционально окрашенных слов и фраз было наиболее простым заданием для детей данного возраста, так как дети могли опираться на семантическую составляющую заданного текста [39]. Усложнение задания заключалось в возможно-

сти использования текстов бессмыслиц – прозаический текст и текст стихотворения с ритмической организацией.

3. Тексты бессмыслиц:

3.1. Искусственная фраза Л.В. Щербы (1930), созданная на основе русского языка, в которой все корневые морфемы заменены на бессмысленные сочетания звуков [42]:

«Глокая кúздра штéко будланúла бóкра и курдýчит бокрёнка».

3.2. Первое четверостишие поэмы Л. Кэрлла «Бармаглот» в переводе С. Маршака (1967), в котором автор использует несуществующие слова:

Варкалось. Хливкие шорьки,

Пырлялись по наве,

И хрюкотали зелюки,

Как мюмзики в мове.

Каждому ребенку предлагалось произносить каждый тип речевого материала по два раза, пытаясь как можно выразительнее изобразить эмоциональные состояния.

Исследование проводили в условиях школьного кабинета, продолжительность составляла 40–60 мин. Запись речи осуществляли на магнитофон «Marantz PMD660» с выносным микрофоном «SENNHEIZER e835S», лицевой экспрессии – на видеокамеру «SONY HDR-CX560». Расстояние от лица ребенка до микрофона составляло от 3 до 50 см.

Применяемые методики

С целью определения отражения детьми эмоциональных состояний в характеристиках голоса и речи проведен инструментальный анализ речи детей и перцептивное исследование.

1. Спектрографический анализ «актерской» и спонтанной речи детей проводили в звуковом редакторе «Cool Edit Pro 2.0».

Считали: значения частоты основного тона (высота голоса – F0, ЧОТ), ЧОТ среднюю, максимальную (F0max), минимальную (F0min), значения интенсивности E0 (дБ), определяли диапазон ЧОТ как разность между ее максимальными и минимальными значениями (F0max – F0min) для фраз; относительное значение интенсивности (E0max / E0min). В работах по изучению акустических характеристик эмоциональной речи показано [32], что ЧОТ и интенсивность являются наиболее информативными характеристиками.

Определяли акустические характеристики речевых сигналов, правильно отнесенных аудиторами к определенным эмоциональным состояниям (0.75–1.0 – вероятность распознавания эмоционального состояния аудиторами).

2. Перцептивное исследование. Исследование заключалось в определении взрослыми эмоционального состояния детей при прослушивании тестовых последовательностей, содержащих их эмоциональную речь. Речевой материал детей (спонтанную эмоциональную речь и «актерскую» речь) первоначально аннотировали три эксперта на пять эмоциональных состояний на основании протокола исследования и просмотра видеозаписей. Для перцептивного исследования выбирали только те высказывания детей, которые были однозначно отнесены к определенному эмоциональному состоянию тремя экспертами (согласованность между экспертами – коэффициент каппа Коэна 1.0). Спонтанная эмоциональная речь детей представляла собой ответные реплики ребенка в диалоге со взрослым: «Я хожу в музыкальную школу», «Мой друг Коля», «У нас дома кот» – фразы детей со словами, отражающими эмоциональные состояния, были исключены из тестовых последовательностей. «Актерская» речь – тексты бессмыслиц «Глокая куздра», «Бармаглот». «Актерскую» речь, представляющую собой слова и фразы, отражающие эмоциональное состояние, не включали в перцептивный эксперимент для того, чтобы взрослые участники перцептивного эксперимента при прослушивании не могли опираться на лингвистическую составляющую речи детей.

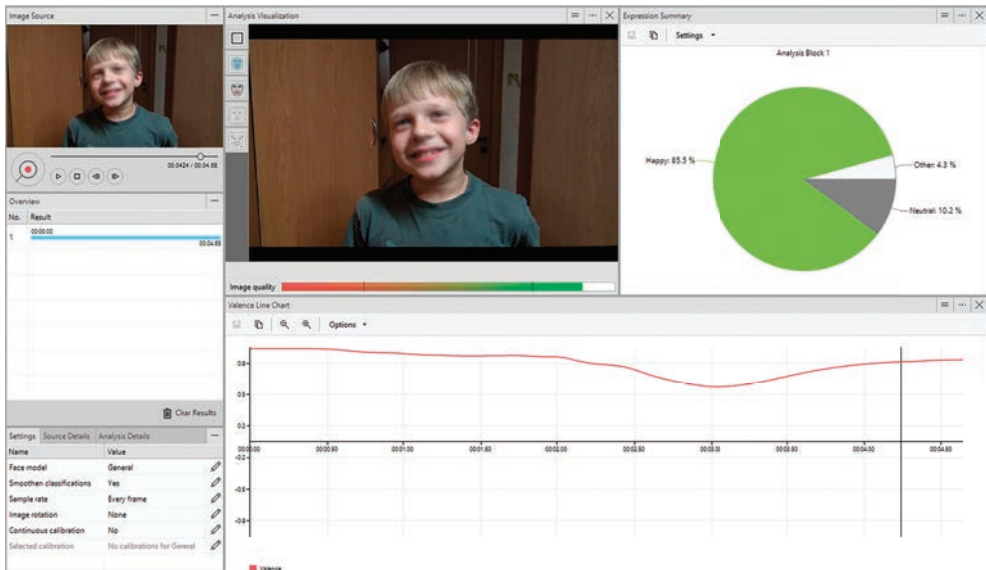


Рис. 1. Программа «FaceReader 8v.» – мимическая экспрессия состояния радости (мальчик 8 лет).

Созданы три тестовые последовательности, включающие по 70 речевых образцов. Интервал между речевыми образцами составлял 5 с. Тестовые последовательности прослушивали взрослые носители русского языка (аудиторы) – 53 человека (возраст 23.9 ± 2.1 лет, 37 женщин, 16 мужчин). Все аудиторы не имели проблем со слухом – 0–25 дБ (метод тональной аудиометрии).

Результаты перцептивного анализа представляли в виде матриц спутывания – таблиц, строки которых соответствуют заданным классам, столбцы – фактическим значениям (реальным классам). Считали: полноту – долю образцов, действительно принадлежащих данному классу, относительно всех образцов этого класса в тестовой выборке; точность – долю образцов, действительно принадлежащих данному классу, относительно всех образцов, которые аудиторы отнесли к данному классу; F-меру – величину, позволяющую оценить соотношение полноты и точности; общую точность распознавания (UAR) для всех эмоциональных состояний.

3. С целью контроля эмоционального состояния ребенка в диалоге с экспериментатором проведен анализ спонтанной мимики детей. С этой целью тремя экспертами отобраны видеофрагменты из диалога экспериментатора с ребенком длительностью одну минуту. Видеофрагменты анализировали в программе «FaceReader 8v.» (Noldus, Нидерланды) (рис. 1). Программное обеспечение FaceReader работает на облачной платформе Microsoft Azure.

Программа «FaceReader 8v.» (Noldus) автоматически на основе заложенных алгоритмов определяет время проявления базовых эмоций в мимике ребенка, средние значения активации и валентности эмоциональных проявлений детей.

4. С целью оценки способности ребенка к определению эмоциональных состояний детям на ноутбуке предъявляли видеотест, содержащий 16 графических изображений, демонстрирующих состояния печали, радости, гнева и нейтральное состояние (по 4 изображения на каждое состояние). Изображения, отражающие состояние страха, не включены в видеотест на основании рекомендаций Этического комитета СПбГУ о проведении исследований с участием детей. Ответы ребенка фиксировали в анкете, затем строили матрицы спутывания.

Для контроля степени активации вегетативной нервной системы (возбуждения ребенка) проводили измерение ЧСС с помощью пульсоксиметра «ChoiceMMed» перед началом записи и после ее завершения.

Ведущее полушарие по речи определяли методом дихотического прослушивания с целью выявления стратегии, используемой ребенком при распознавании и проявлении эмоциональных состояний [43]. Вычисляли коэффициент латерального предпочтения (КЛП):

$$\text{КЛП} = (\text{П} - \text{Л}) \times 100 / (\text{П} + \text{Л}) (\%),$$

где П – количество «правых выборов», т. е. слов из поступивших на правое ухо; Л – количество «левых выборов», т. е. слов из поступивших на левое ухо.

Статистическую обработку данных производили в программе «Statistica 10» с использованием теста Манна – Уитни, ранговой корреляции Спирмена (при уровне значимости $p < 0.05$), регрессионного анализа. Согласованность между экспертами при аннотации данных оценивали на основании коэффициента каппа Коэна [44, 45].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристики эмоциональной речи детей. На основе инструментального анализа речи показано, что значения ЧОТ речи детей являются наиболее высокими в состоянии радости – 310 ± 61 Гц (среднее $\pm$ стандартное отклонение) и страха – 299 ± 54 Гц. Значения ЧОТ для нейтрального (спокойного) состояния составляют 254 ± 34 Гц, состояния печали – 271 ± 45 Гц, гнева – 292 ± 59 Гц. Проведено сравнение характеристик спонтанной и «актерской» речи мальчиков и девочек (табл. 1). Достоверные различия выявлены по значениям интенсивности: в «актерской» речи значения интенсивности выше в нейтральном состоянии, состоянии печали, состоянии радости у мальчиков и девочек. Значения вариативности ЧОТ выше в «актерской» речи в состоянии радости и нейтральном состоянии у мальчиков и девочек. В состоянии гнева у мальчиков вариативность ЧОТ и интенсивность больше в «актерской» речи.

Для спонтанной речи выявлены различия в значениях ЧОТ мальчиков и девочек: в состоянии печали – у мальчиков значения ЧОТ выше, чем у девочек ($p < 0.05$ – критерий Манна – Уитни). В спонтанной речи мальчиков выявлены значимые различия между состояниями печали и нейтральным состоянием – $F_{0\max}$ в нейтральном состоянии ниже, чем в состоянии печали ($p < 0.05$); состоянием печали и гнева – вариативность ЧОТ и $F_{0\max}$ в состоянии печали выше, чем в состоянии гнева ($p < 0.05$). В спонтанной речи девочек – в состоянии радости $F_{0\min}$ выше, чем в нейтральном состоянии ($p < 0.05$).

Для «актерской» речи показаны различия в значениях ЧОТ мальчиков и девочек (рис. 3). Значения ЧОТ мальчиков в состояниях печали ($p < 0.001$), радости ($p < 0.001$) и страха ($p < 0.001$) значимо выше значений ЧОТ в этих состояниях у девочек.

Акустические характеристики «актерской» речи мальчиков и девочек в разных эмоциональных состояниях представлены в табл. 2. Нейтральное состояние у мальчиков характеризуется наименьшими значениями ЧОТ и интенсивности, у девочек – меньшими значениями ЧОТ, вариативности ЧОТ по сравнению с состояниями радости, гнева и страха. У мальчиков в состоянии печали значения ЧОТ ниже, чем в состояниях радости и страха, у девочек – ЧОТ ниже, чем в состоянии радости. Состояние радости характеризуется наибольшими значениями вариативности ЧОТ у девочек, у мальчиков – большими значениями вариативности ЧОТ по сравнению с нейтральным состоянием, состояниями гнева и страха. В состоянии гнева у мальчиков значения ЧОТ меньше, чем в состояниях радости и страха.

Таблица 1. Сравнение спонтанной и «актерской» речи мальчиков и девочек

Пол	Мальчики				Девочки		
Эмоции	Н	П	Р	Г	Н	П	Р
F0cp			A > Cp		A > Cp		A > Cp
p			0.002		0.002		0.012
F0max – F0min	A > Cp		A > Cp	A > Cp	A > Cp		A > Cp
p	0.043		< 0.001	0.004	0.001		< 0.001
E0max/ E0min	A > Cp	A > Cp	A > Cp	A > Cp	A > Cp	A > Cp	A > Cp
p	< 0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	0.012	< 0.001

Обозначения: А – «актерская» речь, Сп – спонтанная речь, Н – нейтральное, П – печаль, Р – радость, Г – гнев, p – уровень значимости (критерий Манна – Уитни).

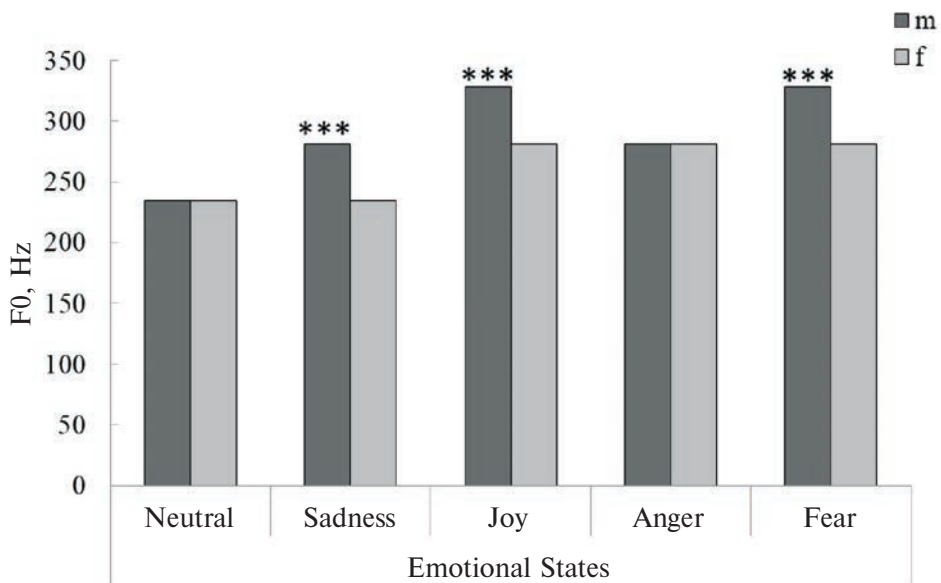


Рис. 2. Значения частоты основного тона «актерской» речи мальчиков и девочек в эмоциональных состояниях – нейтральное, печаль, радость, гнев, страх. По горизонтальной оси отмечены эмоциональные состояния, по вертикальной оси – значения F0, Гц. Столбцы m – значения F0 для мальчиков, столбцы f – значения F0 для девочек. *** – $p < 0.001$ – критерий Манна – Уитни, различия между мальчиками и девочками.

Определена связь между речевым материалом и E0max/E0min: $F(1,339) = 65.737$, $p < 0.0001$ ($R^2 = 0.162$, $\beta = -0.403$) – регрессионный анализ. В спонтанной речи детей значения интенсивности ниже, чем в «актерской» речи. Установлена связь между полом детей и акустическими характеристиками их речи: F0cp $F(1,339) = 34.541$, $p < 0.0001$ ($R^2 = 0.111$, $\beta = -0.333$); F0max – F0min – $F(1,339) = 9.379$, $p < 0.01$ ($R^2 = 0.033$,

Таблица 2. Сравнение акустических характеристик «актерской» речи в разных эмоциональных состояниях у мальчиков и девочек

Пол	Акустические характеристики	Сравнение эмоциональных состояний детей							
Мальчики	F0ср	Н < П	Н < Р	Н < Г	Н < С	П < Р	П < С	Р > Г	С > Г
	<i>p</i>	0.019	< 0.001	0.016	< 0.001	< 0.001	0.025	< 0.001	0.012
	F0max – F0min	Н < П	Н < Р	Н < С	Р > Г	Р > С			
	<i>p</i>	0.048	< 0.001	0.037	< 0.001	< 0.001			
	E0max/ E0min	Н < П	Н < Р	Н < Г	Н < С				
	<i>p</i>	0.001	0.001	0.004	0.002				
Девочки	F0ср	Н < Р	Н < Г	Н < С	П < Р				
	<i>p</i>	< 0.001	0.001	< 0.001	0.008				
	F0max – F0min	Н < Р	Н < Г	Н < С	П < Р	Р > Г	Р > С		
	<i>p</i>	< 0.001	0.033	0.022	0.004	0.011	0.016		
	E0max/ E0min	Н < Р	П < Р						
	<i>p</i>	0.021	0.039						

Обозначения: Н – нейтральное, П – печаль, Р – радость, Г – гнев, С – страх; *p* – уровень значимости (критерий Манна – Уитни).

$\beta = -0.181$). Значения ЧОТ и вариативности ЧОТ у мальчиков выше, чем у девочек. Выявлена связь между эмоциональным состоянием детей и акустическими характеристиками «актерской» речи: F_0 $F(1,289) = 36.577, p < 0.001 (R^2 = 0.312, \beta = 0.312)$; $F_{0max} - F_{0min}$ $F(1,289) = 12.600, p < 0.05 (R^2 = 0.036, \beta = 0.190)$; E_{0max}/E_{0min} $F(1,289) = 18.699, p < 0.001 (R^2 = 0.052, \beta = 0.229)$ – на основании этих характеристик показаны различия между разными эмоциональными состояниями.

Определение взрослыми эмоциональных состояний детей по их речи (данные перцептивного исследования). При распознавании эмоциональных состояний детей между мужчинами и женщинами не выявлено значимых различий, поэтому данные представлены для общей выборки аудиторов. При прослушивании спонтанной речи детей аудиторы лучше распознают состояние радости (64% правильных ответов) и нейтральное состояние (57%), хуже – состояние печали (50%) и гнева (48%). Общая точность распознавания – 0.52. В спонтанной речи мальчиков аудиторы лучше распознают нейтральное состояние (65%) и состояние гнева (64%), хуже – состояние печали (44%) (табл. 3). По спонтанной речи девочек аудиторы лучше распознают состояние радости (76%). Состояние гнева у девочек хуже распознается аудиторами (4%) (табл. 4).

Таблица 3. Матрица спутывания для определения эмоций по спонтанной речи мальчиков, % ответов аудиторов

Состояние	Нейтральное	Печаль	Радость	Гнев
Нейтральное	65	18	8	9
Печаль	37	44	7	12
Радость	38	5	52	5
Гнев	8	22	6	64
Полнота	0.65	0.44	0.52	0.64
Точность	0.44	0.49	0.71	0.71
F1-мера	0.52	0.46	0.60	0.67
UAR (Общая точность распознавания) – 0.56				

Жирным шрифтом выделен % правильных ответов аудиторов при распознавании эмоциональных состояний.

Таблица 4. Матрица спутывания для определения эмоций по спонтанной речи девочек, % ответов аудиторов

Состояние	Нейтральное	Печаль	Радость	Гнев
Нейтральное	53	26	18	3
Печаль	35	56	3	6
Радость	13	9	76	2
Гнев	58	30	8	4
Полнота	0.53	0.56	0.76	0.04
Точность	0.33	0.51	0.74	0.07
F1-мера	0.41	0.51	0.74	0.07
UAR (Общая точность распознавания) – 0.47				

Жирным шрифтом выделен % правильных ответов аудиторов при распознавании эмоциональных состояний.

При распознавании эмоционального состояния детей по тексту бессмыслицы «Бармаглот» аудиторы лучше распознают нейтральное состояние (63%) и состояние радости (60%), хуже – состояние страха (52%), печали (54%) и гнева (47%). Общая точность распознавания – 0.55. По речи мальчиков аудиторы лучше распознают страх (85%), хуже – печаль (54%) (табл. 5). По речи девочек аудиторы лучше распознают нейтральное состояние (64%), хуже – состояние гнева (35%) (табл. 6).

При распознавании эмоционального состояния детей по тексту бессмыслицы «Глокая куздра» аудиторы лучше распознают состояние печали (68%), нейтральное состояние (69%) и состояние радости (60%), хуже – состояние гнева (45%) и страха (40%). Общая точность распознавания – 0.56. При определении эмоциональных состояний мальчиков аудиторы лучше распознают состояние печали (73%), хуже – состояние страха (40%) (табл. 7). При распознавании эмоционального состояния девочек аудиторы лучше распознают нейтральное состояние (84%), хуже – состояние гнева (32%) (табл. 8).

Таблица 5. Матрица спутывания для определения эмоций по «актерской» речи мальчиков – «Бармаглот», %

Состояние	Нейтральное	Печаль	Радость	Гнев	Страх
Нейтральное	61.5	14	13	1,5	10
Печаль	28	54	2	12	4
Радость	25	4	60	4	7
Гнев	23	8	4	65	0
Страх	15	0	0	0	85
Полнота	0.62	0.54	0.60	0.65	0.85
Точность	0.40	0.68	0.76	0.79	0.80
F1-мера	0.49	0.60	0.67	0.71	0.83
UAR – 0.65					

Жирным шрифтом выделен % правильных ответов аудиторов при распознавании эмоциональных состояний.

Таблица 6. Матрица спутывания для определения эмоций по «актерской» речи девочек – «Бармаглот», %

Состояние	Нейтральное	Печаль	Радость	Гнев	Страх
Нейтральное	64	19	0	2	15
Печаль	32	54	0	0	14
Радость	31	0	61	1	7
Гнев	27	3	8	35	27
Страх	31	4	19	2	44
Полнота	0.64	0.54	0.61	0.35	0.44
Точность	0.35	0.68	0.69	0.88	0.41
F1-мера	0.45	0.60	0.65	0.50	0.43
UAR – 0.52					

Жирным шрифтом выделен % правильных ответов аудиторов при распознавании эмоциональных состояний.

Акустические характеристики речевых сигналов, правильно отнесенных к эмоциональным состояниям

Показано, что наиболее значимыми характеристиками при распознавании аудиторами эмоциональных состояний являются минимальные значения ЧОТ, вариативность ЧОТ и интенсивность. Выявлена корреляция между правильным распознаванием эмоционального состояния и акустическими характеристиками речи: $F0_{\min} - F(1,208) = 171.45, p < 0.01 (R^2 = 0.449, \beta = 0.672)$; $E0_{\max}/E0_{\min} - F(1,208) = 60.163, p < 0.001 (R^2 = 0.225, \beta = 0.474)$; $F0_{\max} - F0_{\min} - F(1,208) = 8.634, p < 0.01 (R^2 = 0.035, \beta = 0.199)$.

Нейтральное состояние – $F0_{\min} - 214 \pm 23.5$ Гц; $F0_{\max} - F0_{\min} - 114 \pm 53.9$ Гц; $E0_{\max}/E0_{\min} - 3.5 \pm 3.4$; состояние печали – $F0_{\min} - 214 \pm 32$ Гц; $F0_{\max} - F0_{\min} -$

Таблица 7. Матрица спутывания для определения эмоций по «актерской» речи мальчиков – «Глокая куздра», %

Состояние	Нейтральное	Печаль	Радость	Гнев	Страх
Нейтральное	54	40	2	0	4
Печаль	9	73	3	1	14
Радость	15	4	67	6	8
Гнев	21	4	4	58	13
Страх	14	29	10	7	40
Полнота	0.54	0.73	0.67	0.58	0.40
Точность	0.48	0.49	0.78	0.81	0.51
F1-мера	0.51	0.58	0.72	0.67	0.45
UAR – 0.58					

Жирным шрифтом выделен % правильных ответов аудиторов при распознавании эмоциональных состояний.

Таблица 8. Матрица спутывания для определения эмоций по «актерской» речи девочек – «Глокая куздра», %

Состояние	Нейтральное	Печаль	Радость	Гнев	Страх
Нейтральное	84	7	6	1	2
Печаль	26	64	0	0	10
Радость	45	1	52	0	2
Гнев	36	12	18	32	2
Страх	25	14	19	5	37
Полнота	0.84	0.64	0.52	0.32	0.37
Точность	0.39	0.65	0.55	0.84	0.70
F1-мера	0.53	0.65	0.53	0.46	0.48
UAR – 0.54					

Жирным шрифтом выделен % правильных ответов аудиторов при распознавании эмоциональных состояний.

127 ± 73 Гц; $E0_{\max}/E0_{\min} - 6 \pm 4.4$; состояние радости – $F0_{\min} - 220 \pm 32.6$ Гц; $F0_{\max} - F0_{\min} - 143.5 \pm 65$ Гц; $E0_{\max}/E0_{\min} - 6.5 \pm 6.8$; состояние гнева – $F0_{\min} - 211 \pm 25.2$ Гц; $F0_{\max} - F0_{\min} - 77.8 \pm 38$ Гц; $E0_{\max}/E0_{\min} - 8.5 \pm 3.3$; состояние страха – $F0_{\min} - 249.7 \pm 27.1$ Гц; $F0_{\max} - F0_{\min} - 78.3 \pm 54.3$ Гц; $E0_{\max}/E0_{\min} - 6.7 \pm 9$.

Нейтральное состояние характеризуется меньшими значениями вариативности ЧОТ по сравнению с состояниями радости и страха ($p < 0.05$); состояние гнева – большими значениями интенсивности по сравнению с нейтральным состоянием ($p < 0.05$); состояние радости – большими значениями вариативности ЧОТ по сравнению с состоянием гнева ($p < 0.05$).

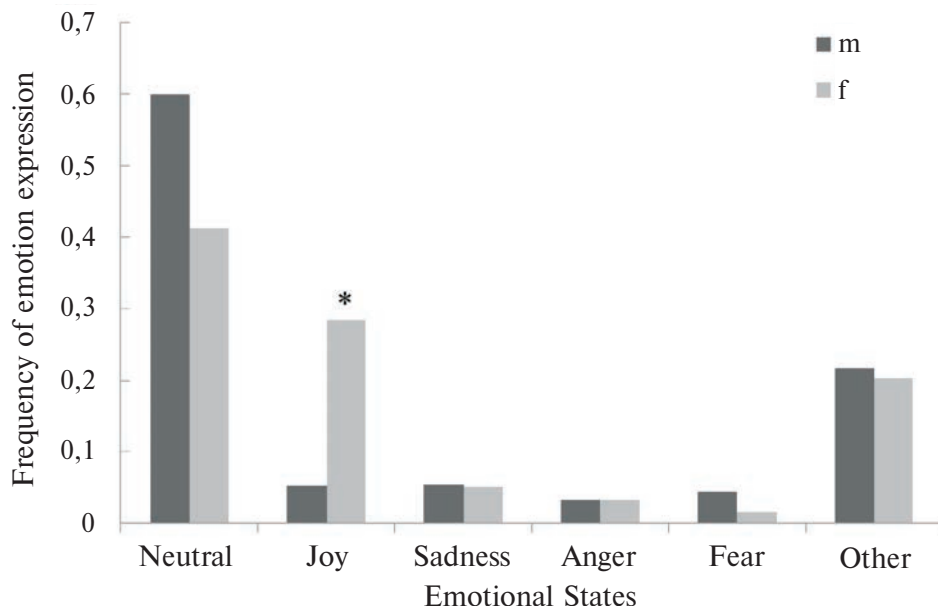


Рис. 3. Частота проявления эмоций в мимике детей. По горизонтальной оси обозначены эмоциональные состояния, по вертикальной оси – частота проявления эмоции в мимике ребенка. Столбцы m – частота проявления эмоций у мальчиков, столбцы f – частота проявления эмоций у девочек. * – $p < 0.05$ – критерий Манна – Уитни, различия между мальчиками и девочками.

Анализ мимической экспрессии детей

Показано, что у девочек и мальчиков преобладающим эмоциональным состоянием в спонтанной мимике является нейтральное состояние (0.6 и 0.41 – частота проявления у мальчиков и девочек соответственно). Состояние радости в мимике девочки (0.29) проявляют чаще, чем мальчики (0.05). Страх в мимике у мальчиков выражается чаще (0.04), чем у девочек (0.01) (рис. 3).

В мимической экспрессии мальчиков преобладают эмоции с негативной валентностью (-0.113 – среднее значение валентности), у девочек – с позитивной валентностью (0.204).

Установлена связь между полом ребенка и частотой проявления в мимике эмоций с позитивной валентностью $F(1,339) = 284.80$, $p < 0.0001$ ($R^2 = 0.456$, $\beta = 0.675$); негативной валентностью $F(1,339) = 223.55$, $p < 0.0001$ ($R^2 = 0.397$, $\beta = -0.630$) – регрессионный анализ. Девочки чаще, чем мальчики, проявляют эмоции с позитивной валентностью.

Распознавание детьми эмоциональных состояний по видеотесту

Дети лучше определяют эмоциональные состояния радости (94% – количество правильных ответов) и печали (92%), хуже распознают нейтральное состояние (74.5%) и состояние гнева (62.5%). Общая точность распознавания – 0.81.

Мальчики (82.2%) лучше девочек (79.2%) распознают эмоциональные состояния по видео тесту ($p < 0.05$) (табл. 9). Девочки лучше распознают состояние печали (100%), чем мальчики (83.3%) ($p < 0.001$) (табл. 10). Мальчики лучше распознают нейтральное состояние (87%), чем девочки (62.5%) ($p < 0.001$).

Таблица 9. Матрица спутывания для определения эмоций по видеотесту мальчиков, %

Состояние	Нейтральное	Печаль	Радость	Гнев
Нейтральное	87	0	8.7	4.3
Печаль	4.2	83.3	4.2	8.3
Радость	8.3	0	91.7	0
Гнев	12.5	16.7	4.2	66.7
Полнота	0.87	0.833	0.92	0.67
Точность	0.78	0.83	0.84	0.84
F1-мера	0.82	0.83	0.88	0.74
UAR – 0.82				

Жирным шрифтом выделен % правильных ответов детей при распознавании эмоциональных состояний по видеотесту.

Таблица 10. Матрица спутывания для определения эмоций по видеотесту девочек, %

Состояние	Нейтральное	Печаль	Радость	Гнев
Нейтральное	62.5	16.7	16.7	4.2
Печаль	0	100	0	0
Радость	4	0	96	0
Гнев	16.7	16.7	8.3	58.3
Полнота	0.63	1	0.96	0.58
Точность	0.75	0.75	0.79	0.93
F1-мера	0.68	0.86	0.87	0.72
UAR – 0.79				

Жирным шрифтом выделен % правильных ответов детей при распознавании эмоциональных состояний по видеотесту.

Связи между проявлением эмоциональных состояний, их распознаванием и психофизиологическими характеристиками детей

На основании регрессионного анализа установлены связи между ведущим полушарием по речи ребенка и: распознаванием аудиторами его эмоциональных состояний $F(1,339) = 28.081, p < 0.0001$ ($R^2 = 0.081, \beta = 0.290$); позитивной валентностью в мимике – $F(1,339) = 6.078, p < 0.05$ ($R^2 = 0.176, \beta = 0.133$); правильным распознаванием ребенком изображений, отнесенных к нейтральному состоянию – $F(1,339) = 74.874, p < 0.001$ ($R^2 = 0.192, \beta = -0.438$). Эмоциональные состояния детей с ведущим правым полушарием по речи лучше распознаются аудиторами. Дети, у которых ведущее полушарие по речи левое, проявляют в мимике меньше эмоций с положительной валентностью и лучше распознают нейтральное состояние по видеотесту. Выявлены связи между значениями ЧСС ребенка и акустическими характеристиками речи: вариативностью

ЧОТ – $F_{0\max} - F_{0\min}$ $F(1,339) = 10.792, p < 0.01$ ($R^2 = 0.03, \beta = 0.176$); $E_{0\max}/E_{0\min} - F(1,339) = 4.215, p < 0.05$ ($R^2 = 0.012, \beta = 0.110$) – чем больше значения ЧСС, тем выше значения вариативности ЧОТ и интенсивности голоса. Показана связь между ЧСС ребенка после записи «актерской» речи и уровнем активации эмоций в мимике $F(1,339) = 5.6290, p < 0.05$ ($R^2 = 0.163, \beta = 0.128$) – чем более возбужден ребенок, тем ярче он проявляет эмоции.

Показано, что дети, которые проявляют больше эмоций с положительной валентностью, хуже распознают эмоциональные состояния гнева и нейтральное состояние по видеотесту. Установлены связи между частотой проявления эмоций с положительной валентностью в мимике ребенка и количеством правильно распознанных ребенком изображений, демонстрирующих нейтральное состояние $F(1,339) = 14.380, p < 0.05$ ($R^2 = 0.044, \beta = -0.201$) и состояние гнева $F(1,339) = 24.826, p < 0.0001$ ($R^2 = 0.073, \beta = -0.271$).

Частота проявления детьми эмоций с негативной валентностью связана с количеством правильно распознанных ребенком изображений, отражающих состояние гнева $F(1,339) = 56.763, p < 0.0001$ ($R^2 = 0.153, \beta = 0.391$). Дети, которые проявляют большее эмоций с негативной валентностью, лучше распознают гнев на изображениях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе на основании стандартизированной методики CEDM-sh получены данные об особенностях отражения эмоций в речи и мимике детей 7–8 лет.

Показаны различия в акустических характеристиках речи детей, отражающей разные состояния: «нейтральное – печаль – радость – гнев – страх». Наши данные согласуются с результатами, полученными в исследованиях детской и взрослой речи на материале разных языков [32, 38, 39, 46–49]: для состояний гнева и страха характерны высокие значения ЧОТ, диапазона ЧОТ и интенсивности, для состояния печали – средние (в сравнении с другими эмоциональными состояниями) значения ЧОТ, диапазона ЧОТ, для нейтрального состояния – низкие значения ЧОТ, ее диапазона и интенсивности [46]. Связь между проявлением эмоциональных состояний и акустическими характеристиками эмоциональной детской речи, выявленная в работе для детей 7–8 лет, согласуется с данными, полученными на материале русского и тамильского языков для детей 8–12 лет [39].

Повышение значений ЧОТ, значений диапазона ЧОТ и интенсивности исследователи связывают со степенью эмоционального возбуждения [31]. Так, для детей дошкольного возраста отмечают связь между эмоциональным возбуждением в состоянии радости и повышением ЧОТ, диапазона ЧОТ и интенсивности [50]. Физиологические изменения, обусловленные активацией вегетативной нервной системы, находят отражение в акустических характеристиках эмоциональной речи [49, 51]. Для всех эмоциональных состояний, кроме нейтрального (спокойного), характерно повышение ЧСС [52], что согласуется с результатами нашего исследования, в котором было показано, что изменение ЧСС связано с акустическими характеристиками речи детей, на которые опираются аудиторы при правильном распознавании эмоциональных состояний.

Перцептивное исследование показало, что взрослые носители языка более успешно определяют базовые эмоции по «актерской» речи детей, чем по спонтанной речи. Эти данные согласуются с результатами кросс-культурного исследования на материале русского и тамильского языков по распознаванию эмоций в спонтанной и «актерской» речи детей 8–12 лет [39]. При прослушивании спонтанной речи мальчиков аудиторы лучше распознавали состояние гнева и нейтральное состояние, хуже – состояние печали; по спонтанной речи девочек лучше распознавали состояние радости, хуже – состояние гнева. По «актерской» речи девочек взрослые также определяли состояние гнева хуже, чем другие эмоциональные состояния. В целом по «актерской» речи детей взро-

слыше хорошо определяли нейтральное состояние, что соответствует данным по распознаванию «актерской» речи взрослых людей, полученным на материале русского языка [53]. В исследованиях Морозова отмечается, что состояние страха по «актерской» речи взрослых распознается лучше, чем радость [53]. В нашей работе такая закономерность показана только для «актерской» речи мальчиков (текст «Бармаглот»), что может быть связано с возрастом информантов и условиями записи.

Дети 7–8 лет при выполнении заданий по методике CEDM (ситуация диалога с экспериментатором) чаще демонстрируют мимику, соответствующую нейтральному состоянию. Девочки чаще, чем мальчики, проявляют эмоции с позитивной валентностью – радость. В исследованиях для детей, растущих в разных культурных средах, показано, что мальчики данного возраста чаще проявляют гнев, а девочки – радость [30]. Значимые различия между мальчиками и девочками в проявлении положительных эмоций отсутствуют в младенческом и дошкольном возрасте, в проявлении гнева межполовые различия не выражены в младенчестве, появляются в дошкольном возрасте, а в подростковом возрасте девочки демонстрируют больше отрицательных эмоций, чем мальчики. Мужчины чаще демонстрируют нейтральное состояние и гнев, женщины – состояние радости [32].

По изображениям, включенным в видеотест, дети лучше определяли состояния радости и печали, чем нейтральное состояние и гнев. Установлена связь между способностью ребенка проявлять негативные эмоции в мимике и распознавать состояние гнева по изображениям. В зарубежных работах [14, 16] показано, что дети 7–8 лет по выражению лица распознают состояние радости лучше, чем состояние гнева и печали. Русские дети 8–9 лет более успешно распознают радость, чем печаль, а печаль – чем гнев [20]. Та же закономерность выявлена для немецких детей дошкольного возраста [15].

Выявлены связи между психофизиологическими особенностями детей и их способностью к проявлению эмоций в речи – аудиторы лучше распознают эмоциональные состояния по речи детей с ведущим правым полушарием по речи, что согласуется с представлениями о роли правого полушария в отражении эмоциональных состояний в речи человека [54]. Правое полушарие связывают с проявлением и регуляцией эмоций в голосе – изменением вариативности ЧОТ и интенсивности [55, 56].

Таким образом, получены нормативные данные об особенностях отражения и восприятия эмоциональных состояний типично развивающимися детьми 7–8 лет, растущими в русскоязычном окружении. Выявлены различия в проявлении эмоций мальчиками и девочками данного возраста. Описаны акустические характеристики эмоциональной речи детей, указаны наиболее информативные характеристики, на которые опираются аудиторы для определения эмоционального состояния по голосу ребенка – $F0_{max}$ – $F0_{min}$, $E0_{max}/E0_{min}$, выявлена связь между этими характеристиками и значениями ЧСС.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены различия в акустических характеристиках речи мальчиков и девочек, отражающей эмоциональные состояния: «нейтральное – печаль – радость – гнев – страх». Показано, что значения частоты основного тона мальчиков выше, чем у девочек, в состояниях печали, радости и страха.

2. Определены особенности распознавания взрослыми эмоциональных состояний детей по речи. Точность распознавания эмоциональных состояний по речи мальчиков выше, чем по речи девочек, лучше аудиторы распознают эмоциональные состояния по «актерской» речи.

3. Описаны особенности отражения эмоциональных состояний детей в мимической экспрессии: в ситуации диалога с экспериментатором девочки чаще проявляют состояние радости в мимике, чем мальчики.

4. Выявлены связи между ведущим полушарием по речи ребенка и его отражением эмоциональных состояний в характеристиках голоса, между значениями ЧСС и акустическими характеристиками голоса.

Полученные данные об особенностях отражения эмоциональных состояний детьми младшего школьного возраста будут дополняться большей выборкой детей, живущих в русскоязычном окружении, и могут быть использованы для сравнительного анализа при исследовании эмоциональной сферы детей с нарушениями развития.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея и дизайн эксперимента (Е. Е. Л.), проведение эксперимента и сбор данных (Е. А. К., О. В. Ф.), обработка данных (Е. А. К.), написание и редактирование текста (Е. А. К., О. В. Ф., Е. Е. Л.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда (проект № 22-45-02007). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного университета, протокол № 115-02-3 от 19.04.2023 г.

Каждый участник (для детей – от их родителей) исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ляксо ЕЕ, Фролова ОВ (ред) (2020) Голосовой портрет ребенка с типичным и атипичным развитием. СПб. Издат-полиграф ассоциация высш учебн завед. [Lyakso EE, Frolova OV (eds) (2020) Voice portrait of a child with typical and atypical devel. Publ house-polygraph association of higher educat institut. (In Russ)].
2. Ekman P (1982) Methods for measuring facial action. Handbook of methods in nonverbal behavior research. New York. Cambridge Univer Press.
3. Izard CE (1977) Theories of Emotion and Emotion-Behavior Relationships. Hum Emot 19–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2209-0_2
4. Hudspeth WJ, Pribram KH (1990) Stages of Brain and Cognitive Maturation. J Educ Psychol 82: 881–884. <https://doi.org/10.1037/0022-0663.82.4.881>
5. Hudspeth WJ, Pribram KH (1992) Psychophysiological indices of cerebral maturation. Int J Psychophysiol 12: 19–29. [https://doi.org/10.1016/0167-8760\(92\)90039-E](https://doi.org/10.1016/0167-8760(92)90039-E)
6. Hernández MM, Eisenberg N, Valiente C, Spinrad TL, Berger RH, VanSchyndel SK, Silva KM, Diaz A, Thompson MS, Gal DE, Southworth J (2018) Bidirectional associations between emotions and school adjustment. J Pers 86: 853–867. <https://doi.org/10.1111/jopy.12361>
7. De Bordes PF, Hasselman F, Cox RFA (2021) Children's perception of facial expressions. Dev Psychol 57: 506–518. <https://doi.org/10.1037/DEV0000979>
8. Thrasher C, Grossmann T (2021) Children's emotion perception in context: The role of caregiver touch and relationship quality. Emotion 21: 273–282. <https://doi.org/10.1037/EMO0000704>

9. Jones DC, Abbey BB, Cumberland A (1998) The Development of Display Rule Knowledge: Linkages with Family Expressiveness and Social Competence. *Child Dev* 69: 1209–1222. <https://doi.org/10.1111/J.1467-8624.1998.TB06168.X>
10. Sauter DA, Panattoni C, Happé F (2013) Children's recognition of emotions from vocal cues. *Br J Dev Psychol* 31: 97–113. <https://doi.org/10.1111/J.2044-835X.2012.02081.X>
11. Casey BJ, Heller AS, Gee DG, Cohen AO (2019) Development of the emotional brain. *Neurosci Lett* 693: 29–34. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2017.11.055>
12. Plessen KJ, Kabicheva G (2010) Hjernens og følelser – fra barn til voksen. *Tidsskr den Nor Laegeforening* 130: 932–935. <https://doi.org/10.4045/TIDSSKR.09.0255>
13. Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL (1999) Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci* 1999 210 2: 861–863. <https://doi.org/10.1038/13158>
14. Widen SC (2013) Children's interpretation of facial expressions: The long path from valence-based to specific discrete categories. *Emot Rev* 5: 72–77. <https://doi.org/10.1177/1754073912451492>
15. Covic A, Von Steinbüchel N, Kiese-Himmel C (2020) Emotion Recognition in Kindergarten Children. *Folia Phoniatr Logop* 72. <https://doi.org/10.1159/000500589>
16. Brechet C (2017) Children's Recognition of Emotional Facial Expressions Through Photographs and Drawings. *J Genet Psychol* 178: 139–146. <https://doi.org/10.1080/00221325.2017.1286630>
17. Kawahara M, Sauter DA, Tanaka A (2021) Culture shapes emotion perception from faces and voices: changes over development. *Cogn Emot* 35: 1175–1186. <https://doi.org/10.1080/02699931.2021.1922361>
18. Дмитриева ЕС, Гельман ВЯ (2018) Восприятие эмоциональной слуховой и зрительной информации и успешность обучения младших школьников. *Психол наука и образов* 23: 29–39 [Dmitrieva ES, Gel'man VYa (2018) Perception of emotional auditory and visual information and the success of learning in younger schoolchildren. *Psiholog nauka i obrazovan* 23: 29–39. (In Russ)].
19. Дмитриева ЕС, Гельман ВЯ, Зайцева КА, Орлова АМ (2006) Исследование восприятия эмоциональной составляющей речевого сигнала при разной длительности стимула. *Физиол челов* 32: 36–41. [Dmitrieva ES, Gel'man VYa, Zajceva KA, Orlova AM (2006) Study of the perception of the emotional component of a speech signal at different stimulus durations. *Fiziol chelov* 32: 36–41. (In Russ)].
20. Дмитриева ЕС, Андерсон МН, Гельман ВЯ (2016) Сравнительное исследование зрительного и слухового восприятия эмоций детьми младшего школьного возраста. *Эксперим психол* 9: 38–52. [Dmitrieva ES, Anderson MN, Gel'man VYa (2016) A comparative study of visual and auditory perception of emotions in children of primary school age. *Eksper psihol* 9: 38–52. (In Russ)].
21. Paine AL, van Goozen SHM, Burley DT, Anthony R, Shelton KH (2023) Facial emotion recognition in adopted children. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 32: 87–99. <https://doi.org/10.1007/S00787-021-01829-Z/TABLES/3>
22. Cannon SA, Chatterjee M (2019) Voice Emotion Recognition by Children with Mild-to-Moderate Hearing Loss. *Ear Hear* 40: 477–492. <https://doi.org/10.1097/AUD.0000000000000637>
23. Maire J, Galera C, Roux S, Bioulac S, Bouvard M, Michel G (2019) Facial emotion recognition in children with or without Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: Impact of comorbidity. *Encephale* 45: 114–120. <https://doi.org/10.1016/J.ENCEP.2018.01.006>
24. Liu Z, Liu J, Zhang Z, Yu H, Hu F (2020) Facial Emotion Recognition and Polymorphisms of Dopaminergic Pathway Genes in Children with ASD. *Behav Neurol* 4: 6376842. <https://doi.org/10.1155/2020/6376842>
25. Portnova GV, Skorokhodov IV, Mayorova LA (2023) The Levels of Auditory Processing during Emotional Perception in Children with Autism. *J Integr Neurosci* 22: 112. <https://doi.org/10.31083/J.JIN2205112/2279F1232C14CCC07A661F8C52328386>
26. Löytömäki J, Laakso ML, Huttunen K (2023) Social-Emotional and Behavioural Difficulties in Children with Neurodevelopmental Disorders: Emotion Perception in Daily Life and in a Formal Assessment Context. *J Autism Dev Disord* 53: 4744–4758. <https://doi.org/10.1007/S10803-022-05768-9/FIGURES/3>
27. Li HCW, Lopez V (2005) Children's Emotional Manifestation Scale: development (in and testing. *J Clin Nurs* 14: 223–229. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2702.2004.01031.X>

28. *Lyakso E, Frolova O, Matveev Y* (2020) Facial expression: Psychophysiological study. *Handb Res Deep Learn Image Anal Under Constrained Unconstrained Environ* 266–289.
<https://doi.org/10.4018/978-1-7998-6690-9.CH014>
29. *Jones AC, Gutierrez R, Ludlow AK* (2021) Emotion production of facial expressions: A comparison of deaf and hearing children. *J Commun Disord* 92: 106113.
<https://doi.org/10.1016/J.JCOMDIS.2021.106113>
30. *Chaplin TM, Aldao A* (2013) Gender differences in emotion expression in children: A meta-analytic review. *Psychol Bull* 139: 735–765.
<https://doi.org/10.1037/A0030737>
31. *Lyakso E, Frolova O* (2015) Emotion state manifestation in voice features: Chimpanzees, human infants, children, adults. *Lect Notes Comput Sci (includ Subser Lect Notes Artif Intell Lect Notes Bioinformat)* 9319: 201–208.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-23132-7_25
32. *Lyakso E, Frolova O, Ruban N, Mekala AM* (2021) Child's Emotional Speech Classification by Human Across Two Languages: Russian & Tamil. *Lect Notes Comput Sci (includ Subser Lect Notes Artif Intell Lect Notes Bioinformat)* 12997 LNAI: 384–396.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-87802-3_35
33. *Lyakso EE, Frolova OV, Nikolaev AS, Grigorev AS* (2022) Perceptual Analysis by Adults of the Speech of Children with Autism Spectrum Disorders, Down's Syndrome, and Intellectual Disabilities. *Neurosci Behav Physiol* 52: 582–590.
<https://doi.org/10.1007/S11055-022-01279-3>
34. *Frolova O, Nikolaev A, Grave P, Lyakso E* (2023) Speech Features of Children with Mild Intellectual Disabilities. *ACM Int Conf Proceed Ser* 406–413.
<https://doi.org/10.1145/3610661.3616236>
35. *Deschamps PKH, Been M, Matthys W* (2014) Empathy and empathy induced prosocial behavior in 6 and 7 year-olds with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 44: 1749–1758.
<https://doi.org/10.1007/s10803-014-2048-3>
36. *Charman T, Ricketts J, Dockrell JE, Lindsay G, Palikara O* (2015) Emotional and behavioural problems in children with language impairments and children with autism spectrum disorders. *Int J Lang Commun Disord* 50: 84–93.
<https://doi.org/10.1111/1460-6984.12116>
37. *Baron-Cohen S, Golan O, Ashwin E* (2009) Can emotion recognition be taught to children with autism spectrum conditions? *Philos Trans R Soc B* 364: 3567–3574.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0191>
38. *Lyakso E, Frolova O, Kleshnev E, Ruban N, Mary Mekala A, Arulalan KV* (2022) Approbation of the Child's Emotional Development Method (CEDM). *ACM Int Conf Proceed Ser* 201–210.
<https://doi.org/10.1145/3536220.3563371>
39. *Lyakso E, Ruban N, Frolova O, Mekala MA* (2023) The children's emotional speech recognition by adults: Cross-cultural study on Russian and Tamil language. *PLoS One* 18: e0272837.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0272837>
40. *Castro SL, Lima CF* (2010) Recognizing emotions in spoken language: a validated set of Portuguese sentences and pseudosentences for research on emotional prosody. *Behav Res Methods* 42: 74–81.
<https://doi.org/10.3758/BRM.42.1.74>
41. *Gilam G, Hendler T* (2016) Deconstructing anger in the human brain. *Curr Top Behav Neurosci* 30: 257–273.
https://doi.org/10.1007/7854_2015_408
42. *Glokaya kuzdra*. : languagehat.com.
<https://languagehat.com/glokaya-kuzdra/>
43. *Вартанян ИА, Галунов ВИ, Дмитриева ЕС, Морозов ВП* (1988) Восприятие речи. Вопросы функциональной асимметрии мозга. СПб. Наука. [*Vartanyan IA, Galunov VI, Dmitrieva ES, Morozov VP* (1988) Speech perception. Issues of functional brain asymmetry. SPb. Nauka. (In Russ)].
44. *McHugh ML* (2012) Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med* 22: 276.
<https://doi.org/10.11613/bm.2012.031>
45. *Rashidah N, Juremi MD, Zulkifley MA, Hussain A, Diyana WM, Zaki W* (2017) Inter-rater reliability of actual tagged emotion categories validation using Cohen's Kappa coefficient. *J Theor Appl Inf Technol* 2017.
<https://jaitit.org/>
46. *Laukka P, Thingujam NS, Iraki FK, Elfenbein HA, Rockstuhl T, Chui W, Althoff J* (2016) The expression and recognition of emotions in the voice across five nations: A lens model analysis based on acoustic features. *J Pers Soc Psychol* 111: 686–705.
<https://doi.org/10.1037/PSPI0000066>

47. *Liu P, Pell MD* (2012) Recognizing vocal emotions in Mandarin Chinese: a validated database of Chinese vocal emotional stimuli. *Behav Res Methods* 44: 1042–1051.
<https://doi.org/10.3758/S13428-012-0203-3>
48. *Juslin PN, Laukka P* (2003) Communication of emotions in vocal expression and music performance: different channels, same code? *Psychol Bull* 129: 770–814.
<https://doi.org/10.1037/0033-2909.129.5.770>
49. *Scherer KR* (1995) Expression of emotion in voice and music. *J Voice* 9: 235–248.
[https://doi.org/10.1016/S0892-1997\(05\)80231-0](https://doi.org/10.1016/S0892-1997(05)80231-0)
50. *Nwokah EE, Davies P, Islam A, Hsu H, Fogel A* (1993) Vocal affect in three-year-olds: A quantitative acoustic analysis of child laughter. *J Acoust Soc Am* 94: 3076–3090.
<https://doi.org/10.1121/1.407242>
51. *Scherer KR* (2003) Vocal communication of emotion: A review of research paradigms. *Speech Commun* 40: 227–256.
[https://doi.org/10.1016/S0167-6393\(02\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S0167-6393(02)00084-5)
52. *Ekman P, Levenson RW, Friesen WV* (1983) Autonomic Nervous System Activity Distinguishes Among Emotions. *Science* 221: 1208–1210.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6612338>
53. *Морозов ВП* (2013) Эмоциональный слух. Экспериментально-психологические исследования. *Психол журн* 34: 45–62. [*Morozov VP* (2013) Emotional hearing. Experimental-psychological research. *Psihol zhurn* 34: 45–62. (In Russ)].
54. *Patel S, Oishi K, Wright A, Sutherland-Foggio H, Saxena S, Sheppard SM, Hillis AE* (2018) Right Hemisphere Regions Critical for Expression of Emotion Through Prosody. *Front Neurol* 9.
<https://doi.org/10.3389/FNEUR.2018.00224>
55. *Shapiro BE, Danly M* (1985) The role of the right hemisphere in the control of speech prosody in propositional and affective contexts. *Brain Lang* 25: 19–36.
[https://doi.org/10.1016/0093-934X\(85\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0093-934X(85)90118-X)
56. *Lindell AK* (2006) In your right mind: Right hemisphere contributions to language processing and production. *Neuropsychol Rev* 16: 131–148.
<https://doi.org/10.1007/S11065-006-9011-9/METRICS>

Peculiarities of the Emotions Manifestation by 7–8 Old Children in Speech and Facial Expressions

E. A. Kleshnev^{a, *}, O. V. Frolova^a, and E. E. Lyakso^{a, **}

^a Saint-Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

*e-mail: kleshnev.egor@gmail.com

**e-mail: lyakso@gmail.com

The purpose of the research was to study the characteristics of the reflection of emotional states “neutral (calm state) — sadness — joy — anger — fear” in the speech and facial expressions of children 7–8 years old and to identify differences in the expression of emotions by boys and girls of this age. The work was carried out as part of a study of the emotional sphere of children with typical and atypical development using the CEDM method for assessing the emotional development of children. 14 children (7 boys, 7 girls) — primary school students — took part in the study. The ability of children to reflect emotions in the characteristics of voice and facial expressions and to recognize emotions was analyzed. For this purpose, speech recording and video recording of children’s facial expressions and behavior, instrumental and perceptual analysis of emotional speech, and automatic analysis of facial expression were carried out. The children’s heart rate was recorded, and the dominant hemisphere was determined by speech using a dichotic test. The features of the reflection of the emotional states of boys and girls in the characteristics of speech are revealed. The specificity of reflecting the emotional states of children in facial expression is described. The connections between the psychophysiological indicators of children and their reflection of emotional states in their voice and facial expressions were determined.

Keywords: emotions, emotional speech, acoustic features, reflection of emotions, school age, children’s speech, auditory perception

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС КАК ТРИГГЕР ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ
ДИСФУНКЦИИ У КРЫС ЛИНИИ WISTAR: РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

© 2024 г. М. Ю. Синицкий¹*, А. В. Синицкая¹, М. В. Хуторная¹, М. А. Асанов¹,
Д. К. Шишкова¹, А. О. Поддубняк¹, А. В. Понасенко¹

¹Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых
заболеваний, Кемерово, Россия

*E-mail: max-sinitsky@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.12.2023 г.

После доработки 30.01.2024 г.

Принята к публикации 05.02.2024 г.

Атеросклероз и ишемическая болезнь сердца являются одними из ведущих причин инвалидизации и смертности среди населения. Показано, что генотоксический стресс потенциально может рассматриваться как новый триггер эндотелиальной дисфункции, лежащей в основе патогенеза данных заболеваний. Цель исследования – оценка молекулярно-генетических маркеров эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с генотоксическим стрессом, у нормолипидемических крыс линии Wistar. В исследование были включены самцы крыс линии Wistar, получавшие инъекции алкилирующего мутагена митомицина С (ММС) в дозировке 0.5 мг/кг массы тела (экспериментальная группа) или 0.9%-ного раствора NaCl (контрольная группа) в хвостовую вену три раза в неделю на протяжении месяца. Уровень генотоксического стресса у животных оценивали с помощью микроядерного теста в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ); эндотелиальную дисфункцию идентифицировали путем оценки экспрессии генов *Vcam1*, *Icam1*, *Sele*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Mif*, *Vwf*, *Serpine1*, *Plau*, *Plat*, *Klf2*, *Klf4*, *Nfe2l2*, *Nos3*, *Snai1*, *Snai2*, *Twist1*, *Zeb1*, *Cdh5* и *Cdh2* в смывах эндотелиального монослоя нисходящей аорты. Установлено, что у крыс из экспериментальной группы развивается выраженный генотоксический стресс, о чем свидетельствует более чем трехкратное повышение частоты ПХЭ с микроядрами и снижение доли ПХЭ в общем пуле проанализированных эритроцитов. Анализ профиля генной экспрессии показал, что у крыс, включенных в экспериментальную группу, наблюдается провоспалительная активация эндотелия, сопровождающаяся повышенной экспрессией генов *Vcam1*, *Icam1*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2* и *Cxcl1*, а также нарушение эндотелиальной механотрансдукции, характеризуемое снижением экспрессии генов *Klf2* и *Klf4*. Таким образом, ММС-индуцированный генотоксический стресс у нормолипидемических крыс линии Wistar ассоциирован с нарушением двух ключевых звеньев патогенеза эндотелиальной дисфункции и может рассматриваться в качестве одного из ее триггеров.

Ключевые слова: повреждение ДНК, мутагенез, атерогенез, эндотелий, микроядерный тест, экспрессия генов, мРНК

DOI: 10.31857/S0869813924040087, **EDN:** CNENSH

ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, атеросклероз и ишемическая болезнь сердца занимают одни из лидирующих позиций в структуре заболеваемости и смертности среди всех патологий сердечно-сосудистой системы [1] с тенденцией к росту до 2030 г. [2]. Доказано, что эндотелиальная дисфункция, определяемая как потеря эндотелием своей противовоспалительной, антитромботической и вазодилатирующей способности, является обязательным инициирующим фактором развития атеросклероза [3]. К числу общепризнанных триггеров дисфункции эндотелия относят турбулентный тип локального кровотока, низкое эндотелиальное напряжение сдвига, метаболический и химический стресс (сахарный диабет, высокий уровень холестерина в крови, курение) [4, 5]. Кроме того, к потенциальным факторам риска развития эндотелиальной дисфункции также можно отнести соматические мутации и повреждение ДНК [6]. Доказано, что генотоксический стресс в культурах первичных эндотелиальных клеток человека сопровождается провоспалительной активацией эндотелия и признаками эндотелиально-мезенхимального перехода, что, в свою очередь, является критериями эндотелиальной дисфункции [7–9]. Несмотря на имеющиеся данные, генотоксический стресс на настоящий момент не рассматривается в качестве подтвержденного патогенетически значимого фактора риска эндотелиальной дисфункции и не учитывается в актуальных клинических рекомендациях по терапии атеросклероза. Для научного обоснования генотоксического стресса как фактора риска дисфункции эндотелия и атеросклероза необходима, в частности, верификация результатов, полученных в экспериментах *in vitro* на моделях лабораторных животных.

Для моделирования генотоксического стресса в экспериментах *in vitro* и *in vivo* широко используется противоопухолевый антибиотик митомин С (ММС) [10], являющийся алкилирующим агентом и проявляющий кластогенную активность [11]. В клетках млекопитающих ММС подвергается восстановительной активации до митозена, который, в свою очередь, в ходе реакции *N*-алкилирования взаимодействует с 7-*N*-гуаниновыми нуклеотидными остатками малой бороздки ДНК в месте расположения димеров CG, что приводит к образованию ковалентных сшивок между основаниями цепей ДНК, препятствующих процессам репликации и транскрипции [12]. Сходным механизмом действия на ДНК млекопитающих обладает также целый ряд эндогенных (побочные продукты метаболизма – бифункциональные альдегиды и азотистая кислота; свободные радикалы) и экзогенных (альдегиды и акролеин, присутствующие в пищевых добавках, пестицидах, табачном дыме и выхлопных газах; компоненты промышленных отходов – алкилгалогениды, алкены, спирты, кетоны, эфиры и сульфиды; ионизирующая радиация) генотоксических агентов [13–16], что позволяет использовать ММС в качестве модельного мутагена в генотоксикологических исследованиях.

Целью данного исследования явилась оценка молекулярно-генетических маркеров эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с генотоксическим стрессом, у нормолипидемических крыс линии Wistar.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование генотоксического стресса

В исследование были включены самцы нормолипидемических крыс линии Wistar (масса тела 150–200 г, возраст 10 недель), полученные из вивария отдела экспериментальной медицины Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия). Животных распределяли по полипропиленовым клеткам, высланным деревянной щепой, и обеспечивали

неограниченный доступ к пище и воде. На протяжении всего эксперимента животных содержали при стандартных температурных условиях (24 ± 1 °C), относительной влажности $55 \pm 10\%$ и 12-часовых циклах смены света и темноты. Мониторинг состояния здоровья животных проводили ежедневно. Крыс по группам и клеткам распределяли без рандомизации и применения каких-либо критериев включения и исключения.

Для моделирования генотоксического стресса выполняли инъекции алкилирующего мутагена MMC (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США) в дозировке 0.5 мг/кг массы тела (экспериментальная группа, 10 крыс) или 0.9%-ного раствора NaCl (контрольная группа, 10 крыс) в хвостовую вену три раза в неделю на протяжении одного месяца, без какого-либо хирургического вмешательства. Через сутки после последней инъекции животных выводили из эксперимента путем внутрибрюшинной инъекции пенто-барбитала натрия (100 мг/кг массы тела).

Дозировка MMC была выбрана на основе литературных данных [17, 18] и результатов собственных экспериментов [19]. Контроль массы тела животных и корректировку дозы MMC проводили еженедельно.

Оценка уровня генотоксического стресса

Уровень генотоксического стресса у животных, включенных в эксперимент, оценивали с помощью микроядерного теста в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) [20, 21]. Эксплантированную бедренную кость очищали от остатков мышечной ткани и удаляли эпифизы, после чего вымывали костный мозг 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) в пробирки типа Эппендорф объемом 1.5 мл. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, удаляли надосадочную жидкость, приливали в каждую пробирку 500 мкл свежей эмбриональной телячьей сыворотки и ресуспендировали клетки. Далее пробирки снова центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и частично удаляли надосадочную жидкость до ее финального объема 50–100 мкл. Клетки ресуспендировали и раскапывали на край сухих обезжиренных предметных стекол, после чего распределяли клеточную суспензию по всей площади предметного стекла и высушивали получившиеся препараты на воздухе. Далее препараты фиксировали в метаноле в течение 5 мин и окрашивали 2%-ным раствором красителя Гимза (ПанЭко, Россия) в течение 10 мин при комнатной температуре.

Полученные цитогенетические препараты кодировали и анализировали под световым микроскопом Zeiss Axiostar Plus (Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Германия) при увеличении $\times 1000$. На каждом препарате анализировали 200 эритроцитов, определяя количество нормохроматофильных эритроцитов (НХЭ) и ПХЭ. Далее анализировали еще 1000 ПХЭ и отмечали клетки с микроядрами (МЯ). НХЭ, ПХЭ и МЯ идентифицировали согласно общепринятым критериям [21].

Оценка маркеров эндотелиальной дисфункции

Оценку маркеров эндотелиальной дисфункции проводили путем измерения экспрессии генов, участвующих в провоспалительной (*Vcam1*, *Icam1*, *Sele*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Mif*) и протромботической активации эндотелия (*Vwf*, *Serpine1*, *Plau*, *Plat*), нарушении эндотелиальной механотрансдукции (*Klf2*, *Klf4*, *Nfe2l2*) и синтеза оксида азота (*Nos3*), эндотелиально-мезенхимальном переходе (*Snai1*, *Snai2*, *Twist1*, *Zeb1*, *Cdh5*, *Cdh2*) [22] в эндотелиальном монослое аорт лабораторных животных. Эксплантированную нисходящую аорту промывали от остатков крови 0.9%-ным раствором NaCl, а затем смывали эндотелиальный монослой 1 мл лизирующего реагента QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen, США) в 1.5-миллилитровую пробирку типа Эппен-

дорф [23]. Выделение РНК и ее очистку от геномной ДНК проводили с помощью коммерческого набора RNeasy® Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя набора. Концентрацию и качество выделенной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific, США), а ее целостность – на флуориметре Qubit 4 (Invitrogen, США) с использованием набора реагентов Qubit™ RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, США). Выделенную РНК хранили при температуре –80 °С.

На основе выделенной РНК с помощью коммерческого набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) синтезировали комплиментарную ДНК (кДНК), определяли ее концентрацию и качество на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific, США). Синтезированную кДНК хранили при –20 °С.

Экспрессию генов интереса, а также референсных генов (*Actb*, *B2m*, *Tbp*) оценивали с помощью количественной ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (реал-тайм ПЦР) на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США) в строгом соответствии с общепринятыми на настоящий момент стандартами [24, 25]. ПЦР проводили в 96-луночном планшете (BIOFIL, Китай), содержащем, помимо анализируемых образцов, пять стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль (реакционная смесь без кДНК). На каждый анализируемый образец готовили 10 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл мастер-микса PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, США), по 500 нМ прямого и обратного SYBR Green праймеров (Евроген, Россия) (табл. 1) и 5 мкл кДНК с финальной концентрацией 10 нг/мкл. Каждый образец, стандарт и отрицательный контроль анализировали в трех технических повторах. Программа амплификации включала в себя три этапа: 2 мин при 50 °С, 2 мин при 95 °С, 15 с при 95 °С и 60 с при 60 °С (40 циклов). Экспрессию генов интереса рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ и выражали в виде кратности ее изменения в экспериментальной группе относительно контроля.

Статистический анализ

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в эксперименте

Ген	Последовательность
<i>Vcam1</i>	Прямой: 5'-GGAAATGCCACCCTCACCTTA-3' Обратный: 5'-TCCAGGGGAGATGTCAACACAGT-3'
<i>Icam1</i>	Прямой: 5'-CGACATTGGGGAAGACAGCAG-3' Обратный: 5'-TCCACTCGCTCTGGGAACG-3'
<i>Sele</i>	Прямой: 5'-TGTGGTCCAAGAGGGGAGTG-3' Обратный: 5'-GCCCACTGCAACTCATGTTCA-3'
<i>Selp</i>	Прямой: 5'-GCCCTCCAATGTGTGAAGCC-3' Обратный: 5'-CAGGTGGAGCCGACACTGAA-3'
<i>Il6</i>	Прямой: 5'-AGCCCACCAGGAACGAAAGTC-3' Обратный: 5'-AGGGAAGGCAGTGGCTGTCA-3'
<i>Ccl2</i>	Прямой: 5'-ACGCTTCTGGGCCTGTTGTT-3' Обратный: 5'-TCCAGCCGACTCATTTGGGAT-3'
<i>Cxcl1</i>	Прямой: 5'-CACTGCACCCAAACCGAAGT-3' Обратный: 5'-TGGGGACACCCTTTAGCATCT-3'

Ген	Последовательность	<i>Окончание табл. 1</i>
<i>Mif</i>	Прямой: 5'-GTCACGTAGCTCAGGTCCCA-3' Обратный: 5'-CTCGGAGAGAAACCCCTCTG-3'	
<i>Vwf</i>	Прямой: 5'-AACCCACGCTTGACCAGGTT-3' Обратный: 5'-CTGTCAGCGCAGGAGCAAAC-3'	
<i>Serpine1</i>	Прямой: 5'-CTCAACCCAGGCCGACTTCA-3' Обратный: 5'-CACTGTGCCGCTCTCGTTCA-3'	
<i>Plau</i>	Прямой: 5'-GTGGTGGGAGCCTCATCAGT-3' Обратный: 5'-CGCTTCGACTGACCCAGGTA-3'	
<i>Plat</i>	Прямой: 5'-GGGACCAACTGAGGACTGCT-3' Обратный: 5'-GCCCTCCACGCTGTGTAAGT-3'	
<i>Klf2</i>	Прямой: 5'-CACCAACTGCGGCAAGACCT-3' Обратный: 5'-GTAGTGGCGGGTAAGCTCGTCA-3'	
<i>Klf4</i>	Прямой: 5'-GACTATGCAGGCTGTGGCAAA-3' Обратный: 5'-CGGTAGTGCCTGGTCAAGTTCA-3'	
<i>Nfe2l2</i>	Прямой: 5'-CAGTGGATCTGTCTAGCTACTCC-3' Обратный: 5'-CTCTCAACGTGGCTGGGAAT-3'	
<i>Nos3</i>	Прямой: 5'-GGTGACCAGCACATTTGGCA-3' Обратный: 5'-GCCGCCAAGAGGATACCAGT-3'	
<i>Snai1</i>	Прямой: 5'-TGGGCCAACTTCCCAAGCA-3' Обратный: 5'-GTGGGAGCAGGAGAAAGGCT-3'	
<i>Snai2</i>	Прямой: 5'-GCCCAACTACAGCGAACTGGA-3' Обратный: 5'-TGGAATGGAAGTCTGATGTCC-3'	
<i>Twist1</i>	Прямой: 5'-ATGTCCGCGTCCCCTAGCA-3' Обратный: 5'-CCCCACGCCCTGATTCTTGT-3'	
<i>Zeb1</i>	Прямой: 5'-CCAGTGAAGGTGATCCAGCCA-3' Обратный: 5'-CTTTTGGGTGGCGTGCAGT-3'	
<i>Cdh5</i>	Прямой: 5'-ACAAGGACGTGGTGCCAGTA-3' Обратный: 5'-GGGCATCCCATTTGTCGAGA-3'	
<i>Cdh2</i>	Прямой: 5'-ACCCAGGAAAAGTGGCAGGT-3' Обратный: 5'-GCTGTGCTTGGCGAGTTGTC-3'	
<i>Actb</i>	Прямой: 5'-ACAACCTTCTTGCAGTCTCTC-3' Обратный: 5'-CCATACCCACCATCACACCCT-3'	
<i>B2m</i>	Прямой: 5'-GGTGACCGTGATCTTTCTGGTG-3' Обратный: 5'-TGAGGAAGTTGGGCTTCCCAT-3'	
<i>Tbp</i>	Прямой: 5'-TGCCAAGTGTGAGCCTCTCC-3' Обратный: 5'-TGGGTATATCGCACGCACCAT-3'	

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Для количественных показателей рассчитывали медиану (Me) и межквартильный размах (IQR). Различия между группами оценивали с помощью рангового *U*-критерия Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ уровня маркеров генотоксического стресса показал, что у животных из экспериментальной группы по сравнению с контролем отмечается полтора-кратное снижение доли ПХЭ в общем пуле проанализированных эритроцитов ($31.8 \pm 5.5\%$ против $45.0 \pm 10.5\%$, $p < 0.001$) и более чем трехкратное повышение частоты ПХЭ с МЯ ($2.7 \pm 1.0\%$ против $0.8 \pm 0.4\%$, $p < 0.001$) (рис. 1), что свидетельствует о развитии выраженного генотоксического стресса в ответ на экспозицию ММС.

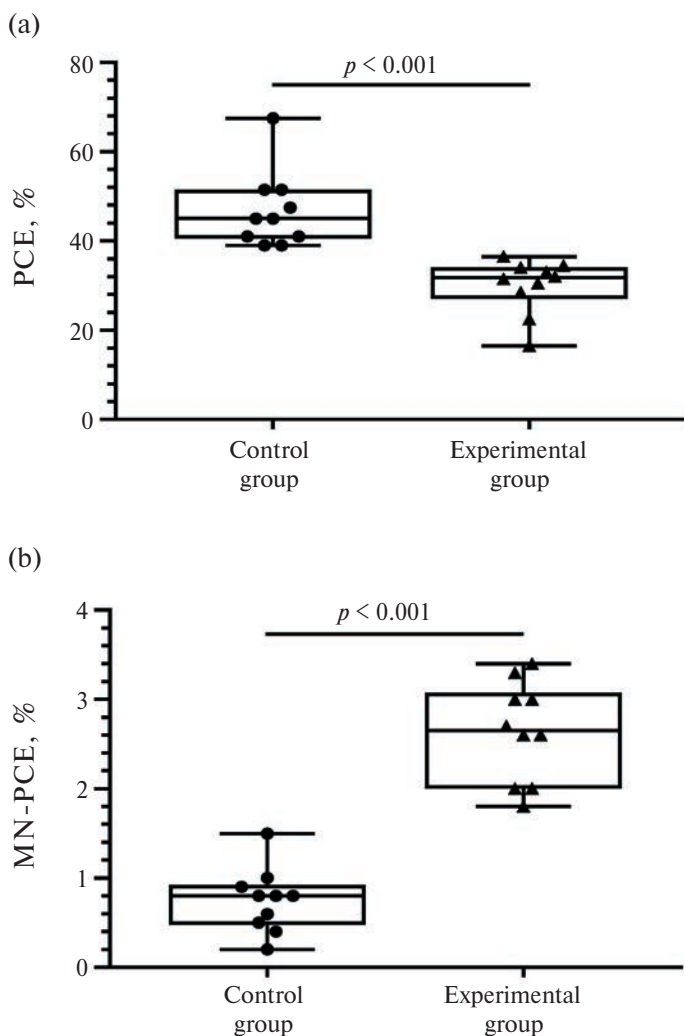


Рис. 1. Уровень маркеров генотоксического стресса у крыс линии Wistar. (a) – Доля ПХЭ. (b) – Частота ПХЭ с МЯ. Control group – контрольная группа, Experimental group – экспериментальная группа, PCE – ПХЭ, MN-PCE – ПХЭ с МЯ.

В результате проведенного молекулярно-генетического анализа все изученные гены были разделены на три группы в зависимости от характера изменения их экспрессии в экспериментальной группе относительно контроля: гены с повышенной экспрессией (кратность изменения экспрессии ≥ 1.50), гены с пониженной экспрессией (≤ 0.75), гены, экспрессия которых не изменялась (0.76–1.49) (табл. 2).

Таблица 2. Изменение экспрессии генов-маркеров эндотелиальной дисфункции в эндотелии аорты крыс линии Wistar, включенных в экспериментальную группу, относительно контроля

Ген	Кратность изменения экспрессии	Характер изменения экспрессии
Провоспалительная активация эндотелия		
<i>Vcam1</i>	2.17	Повышена
<i>Icam1</i>	3.51	Повышена
<i>Sele</i>	0.76	Без изменений
<i>Selp</i>	2.59	Повышена
<i>Il6</i>	1.78	Повышена
<i>Ccl2</i>	1.91	Повышена
<i>Cxcl1</i>	2.06	Повышена
<i>Mif</i>	0.42	Понижена
Протромбическая активация эндотелия		
<i>Vwf</i>	0.58	Понижена
<i>Serpine1</i>	2.26	Повышена
<i>Plau</i>	1.95	Повышена
<i>Plat</i>	1.76	Повышена
Нарушение эндотелиальной механотрансдукции		
<i>Klf2</i>	0.55	Понижена
<i>Klf4</i>	0.60	Понижена
<i>Nfe2l2</i>	0.87	Без изменений
Нарушение синтеза оксида азота		
<i>Nos3</i>	1.12	Без изменений
Эндотелиально-мезенхимальный переход		
<i>Snai1</i>	0.98	Без изменений
<i>Snai2</i>	0.82	Без изменений
<i>Twist1</i>	0.87	Без изменений
<i>Zeb1</i>	0.65	Понижена
<i>Cdh5</i>	1.10	Без изменений
<i>Cdh2</i>	1.11	Без изменений

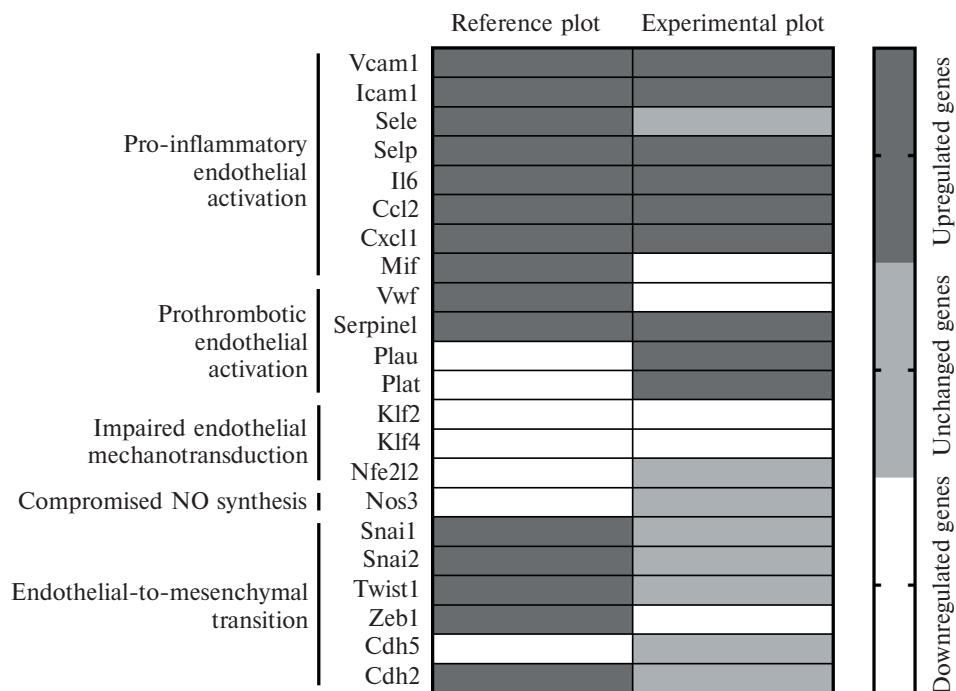


Рис. 2. Сравнение полученного профиля генной экспрессии в эндотелии нисходящей аорты нормолипидемических крыс линии Wistar с референсной панелью для скрининга дисфункции эндотелия. Reference plot – референсная панель по данным Kutikhin и соавт. [22]; Experimental plot – экспериментальная панель, полученная в ходе проведения представленного исследования; Pro-inflammatory endothelial activation – провоспалительная активация эндотелия; Prothrombotic endothelial activation – протромботическая активация эндотелия; Impaired endothelial mechanotransduction – нарушение эндотелиальной механотрансдукции; Compromised NO synthesis – нарушение синтеза оксида азота; Endothelial-to-mesenchymal transition – эндотелиально-мезенхимальный переход. Upregulated genes – гены с повышенной экспрессией, Unchanged genes – гены, экспрессия которых не изменялась, Downregulated genes – гены со сниженной экспрессией.

В результате проведенного сравнения полученных результатов изучения профиля генной экспрессии в эндотелии нисходящей аорты нормолипидемических крыс линии Wistar с референсной панелью для скрининга дисфункции эндотелия [22] были выявлены совпадения в характере изменения экспрессии следующих генов-маркеров эндотелиальной дисфункции: *Vcam1*, *Icam1*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Serpine1*, *Klf2* и *Klf4* (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ данных мировой литературы последних лет показывает рост интереса к изучению различных аспектов нормальной и патологической физиологии эндотелия, в том числе и к проблемам патофизиологических механизмов развития эндотелиальной дисфункции [22]. К настоящему моменту выделены ключевые признаки данного процесса, а именно: повышенная адгезия лейкоцитов к эндотелиальному монослою (провоспалительная активация эндотелия); нарушение синтеза биодоступного оксида азота; нарушение эндотелиальной механотрансдукции; эндотелиально-мезенхимальный переход, заключающийся в приобретении эндотелиальными клетками синтети-

ческого фенотипа; а также протромбическая активация эндотелия [26–30]. Наиболее удобным методом скрининга эндотелиальной дисфункции в эксперименте является оценка экспрессии маркерных генов, вовлеченных в вышеуказанные процессы, с помощью количественной ПЦР в силу относительно невысокой стоимости и низкой технической сложности данного метода. Анализ научной литературы, посвященной изучению патофизиологии эндотелиальной дисфункции, а также собственный многолетний опыт экспериментов по ее моделированию позволил разработать референсную панель для скрининга данного патологического состояния, включающую 23 маркерных гена, показавших наибольшую эффективность при диагностике эндотелиальной дисфункции в экспериментах *in vitro* и *in vivo* и обладающих высокой доказательной мощностью [22].

Одним из основных признаков эндотелиальной дисфункции является провоспалительная активация эндотелия, одним из результатов которой является миграция в интиму сосудов моноцитов. Мигрировавшие моноциты трансформируются в макрофаги, которые начинают поглощать свободный и этерифицированный холестерин и в конечном итоге превращаются в пенистые клетки, секретирующие различные факторы роста и митогены, способствующие развитию атеросклеротического поражения сосуда [31]. Провоспалительная активация эндотелия обуславливается двумя ключевыми процессами – связывание рецепторов лейкоцитов с соответствующими рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, приводящее к адгезии клеток мононуклеарной фракции крови к эндотелиальному монослою; и повышенная секреция эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов [32]. В нашем эксперименте ММС-индуцированный генотоксический стресс у нормолипидемических крыс линии Wistar (подтвержденный результатами цитогенетического анализа ПХЭ) был ассоциирован с повышением экспрессии трех из четырех маркерных генов, кодирующих как рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов (*Vcam1*, *Icam1* и *Selp*), так и эндотелиальные провоспалительные цитокины (*Il6*, *Ccl2* и *Cxcl1*) в смывах эндотелиального монослоя нисходящей аорты. Эти данные свидетельствуют о выраженной провоспалительной активации эндотелия у лабораторных животных. Известно, что клеточный ответ на генотоксический стресс заключается в остановке клеточного цикла, запуске репарации ДНК и активации сигнальных путей p53 и NF-κB, играющих ключевую роль в репарации ДНК и воспалительном ответе соответственно [33]. Интересно, что активация пути NF-κB в результате действия на клетки алкилирующих агентов (например, ионизирующей радиации) может выступать индуктором таких антиапоптотических генов, как *BCL2L1*, *XIAP*, *CIAP1*, *CIAP2* и *BIRC5*, что приводит к увеличению выживаемости экспонированных клеток [34–37]. Кроме того, показано, что ММС может воздействовать на MAPK-путь, что приводит к увеличению уровня экспрессии провоспалительных цитокинов фибробластами [38]. Согласно современным концепциям, воспаление может являться ранним сигналом повреждения генетического материала клетки [39, 40], что позволяет рассматривать повреждение ДНК как своеобразный DAMP (damage-associated molecular pattern) [41]. Таким образом, обнаруженная в нашем эксперименте ассоциированная с генотоксическим стрессом провоспалительная активация эндотелиальных клеток нисходящей аорты нормолипидемических крыс линии Wistar является, с одной стороны, нормальной физиологической реакцией клеток на повреждение ДНК, а с другой стороны – одним из патофизиологических звеньев атерогенеза. Интересно, что в нашем эксперименте обнаружено снижение экспрессии гена *Mif*, кодирующего фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF) в ответ на генотоксический стресс, на фоне повышения экспрессии других генов, кодирующих вовлеченные в провоспалительную активацию эндотелия белки. В ряде исследований показано, что MIF, помимо своей провоспалительной активности, способен блокировать p53-зависимый апоптоз и стимулировать онкогенез, при этом данные факторы в клетке функционально противодействуют друг другу (активация пути p53 сопро-

ждается снижением экспрессии MIF) [42–45]. Таким образом, обнаруженное в нашем эксперименте снижение экспрессии гена *Mif* является, вероятно, следствием ММС-индуцированной активации пути p53.

Еще одним немаловажным признаком эндотелиальной дисфункции является нарушение эндотелиальной механотрансдукции – процесса трансформации механического воздействия потока в биохимические сигналы в эндотелиальных клетках. Данный процесс играет чрезвычайно важную роль в физиологии эндотелия, так как обуславливает дифференциальную чувствительность различных сосудов к атеросклерозу в зависимости от гидродинамических характеристик тока крови (турбулентный и ламинарный поток) [28, 29, 32]. Передача сигналов от механосенсоров в клетке осуществляется посредством большого количества молекул, в число которых входят и атеропротективные транскрипционные факторы KLF2, KLF4 и NRF2 [46–51], кодируемые генами *Klf2*, *Klf4* и *Nfe2l2* соответственно. В нашем эксперименте было обнаружено снижение экспрессии генов *Klf2* и *Klf4* в эндотелии аорты крыс линии Wistar в ответ на их экспозицию ММС, в то время как экспрессия гена *Nfe2l2* не изменялась относительно контроля. Атеропротективные свойства KLF2 обусловлены его способностью индуцировать экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) – важного регулятора сосудистого гомеостаза – путем прямого связывания ее промотора в ответ на биомеханические стимулы. Кроме того, KLF2 способен ингибировать индукцию молекул клеточной адгезии VCAM-1 и SELE, вызванную действием на эндотелиальные клетки различных провоспалительных цитокинов, что приводит к ослаблению адгезии мононуклеарной фракции крови к эндотелию [52]. Показано, что данный транскрипционный фактор также может регулировать активность таких генов, участвующих в регуляции тонуса сосудов, как *ACE*, *EDN* и *ADM* [53]. Сходными эффектами обладает и другой транскрипционный фактор KLF4, который способен воздействовать на путь NF-κB, тем самым снижая экспрессию провоспалительных молекул. Он также способен связываться с коактиватором транскрипции p300, усиливая экспрессию eNOS и тромбомодулина [48]. Также было показано, что атеропротективный ламинарный тип напряжения сдвига способен индуцировать KLF4 и KLF2 посредством активации сигнального пути MEK5/MEF2 [54]. Таким образом, полученные в данном исследовании данные о снижении экспрессии атеропротективных транскрипционных факторов позволяют говорить о нарушении эндотелиальной механотрансдукции, ассоциированной с ММС-индуцированным генотоксическим стрессом.

В нашем эксперименте не удалось обнаружить дифференциальную экспрессию генов, регулирующих такие критерии эндотелиальной дисфункции, как эндотелиально-мезенхимальный переход и нарушение синтеза оксида азота. Следует отметить, что данные процессы характеризуют поздние стадии развития дисфункции эндотелия и достаточно сложно регистрируются на начальных этапах патологического изменения эндотелия. Их моделирование в эксперименте *in vivo* требует пролонгированной экспозиции лабораторных животных теми или иными триггерами эндотелиальной дисфункции, что в случае с использованием мутагенных агентов не всегда допустимо, так как способно привести к гибели животного в связи с критической дисфункцией различных органов и систем. Другим вероятным объяснением полученных результатов может служить особенность механизма действия ММС как триггера эндотелиальной дисфункции, который в первую очередь воздействует на сигнальные пути, вовлеченные в воспалительный ответ и внутриклеточный сигналинг.

Одним из новых критериев дисфункции эндотелия, рассматриваемым главным образом в контексте COVID-19, является протромботическая активация эндотелия, сопровождаемая повышением экспрессии фактора фон Виллебранда (vWF) и ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) с одновременным снижением экспрессии активаторов плазминогена uPA и tPA [55–57]. В нашем эксперименте в эндотелии нисходящей аорты крыс линии Wistar, экспонированных ММС, был обнаружен только один ген

Serpine1 (кодирующий PAI-1), экспрессия которого соответствовала референсной панели дисфункции эндотелия (характер экспрессии остальных генов был диаметрально противоположен референсу), что не позволяет с уверенностью говорить о протромботической активации эндотелия в ответ на генотоксический стресс у лабораторных животных. В силу относительной новизны данного критерия дисфункции эндотелия и отсутствия достаточного пула экспериментальных данных интерпретация полученных в настоящем исследовании результатов затруднена и требует дополнительных механизмов изучения, лежащих в основе изменения экспрессии генов-маркеров протромботической активации эндотелия в ответ на генотоксический стресс.

Таким образом, ММС-индуцированный генотоксический стресс у нормолипидемических крыс линии Wistar ассоциирован с нарушением двух ключевых звеньев патогенеза эндотелиальной дисфункции (провоспалительная активация эндотелия и нарушение эндотелиальной механотрансдукции) и может рассматриваться в качестве одного из ее триггеров.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М. Ю. С.), проведение экспериментов (А. В. С., М. В. Х., М. А. А., Д. К. Ш., А. О. П.), обработка данных (М. Ю. С.), написание манускрипта (М. Ю. С.), редактирование рукописи (А. В. П.), окончательное утверждение текста рукописи (М. Ю. С., А. В. С., М. В. Х., М. А. А., Д. К. Ш., А. О. П., А. В. П.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Российского научного фонда № 21-75-10052 «Молекулярные механизмы развития эндотелиальной дисфункции в ответ на генотоксический стресс», <https://rscf.ru/project/21-75-10052/>. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (протокол № 05 от 13 апреля 2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *GBD 2017* (2018) Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392: 1736–1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7)
2. *Mathers CD, Loncar D* (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3: e442. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
3. *Bertani F, Di Francesco D, Corrado MD, Talmon M, Fresu LG, Boccafroschi F* (2021) Paracrine Shear-Stress-Dependent Signaling from Endothelial Cells Affects Downstream Endothelial Function and Inflammation. *Int J Mol Sci* 22: 13300 <https://doi.org/10.3390/ijms222413300>
4. *Feldman CL, Stone PH* (2000) Intravascular hemodynamic factors responsible for progression of coronary atherosclerosis and development of vulnerable plaque. *Curr Opin Cardiol* 15: 430–440. <https://doi.org/10.1097/00001573-200011000-00010>
5. *Douglas G, Channon KM* (2014) The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine* 42: 480–484. <https://doi.org/10.1016/j.mpmmed.2014.06.011>

6. *Kutikhin AG, Sinitsky MY, Ponasenko AV* (2017) The role of mutagenesis in atherosclerosis. *Complex Issues Cardiovasc Diseases* 6: 92–101.
<https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-1-92-101>
7. *Sinitsky MY, Kutikhin AG, Tsepokina AV, Shishkova DK, Asanov MA, Yuzhalin AE, Minina VI, Ponasenko AV* (2020) Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 858–860: 503252.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503252>
8. *Sinitsky MY, Tsepokina AV, Kutikhin AG, Shishkova DK, Ponasenko AV* (2021) The gene expression profile in endothelial cells exposed to mitomycin C. *Biochemistry (Moscow) Suppl Ser B: Biomed Chem* 15: 255–261.
<https://doi.org/10.1134/S1990750821030100>
9. *Sinitsky MY, Sinitskaya AV, Shishkova DK, Ponasenko AV* (2022). Genotoxic stress leads to the proinflammatory response of endothelial cells: an *in vitro* study. *Biom Khim* 68: 361–366.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20226805361>
10. *Lee YJ, Park SJ, Ciccone SL, Kim CR, Lee SH* (2006) An *in vivo* analysis of MMC-induced DNA damage and its repair. *Carcinogenesis* 27: 446–453.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgi254>
11. *Rosefort C, Fauth E, Zankl H* (2004) Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis* 19: 277–284.
<https://doi.org/10.1093/mutage/geh028>. PMID: 15215326
12. *Rink SM, Lipman R, Alley SC, Hopkins PB, Tomasz M* (1996) Bending of DNA by the mitomycin C-induced, GpG intrastrand cross-link. *Chem Res Toxicol* 9: 382–389.
<https://doi.org/10.1021/tx950156q>
13. *Caulfield JL, Wishnok JS, Tannenbaum SR* (2003) Nitric oxide-induced interstrand cross links in DNA. *Chem Res Toxicol* 16: 571–574.
<https://doi.org/10.1021/tx020117w>
14. *Colis LC, Raychaudhury P, Basu AK* (2008) Mutational specificity of gamma-radiation-induced guanine-thymine and thymine-guanine intrastrand cross-links in mammalian cells and translesion synthesis past the guanine-thymine lesion by human DNA polymerase η . *Biochemistry* 47: 8070–8079.
<https://doi.org/10.1021/bi800529f>
15. *Stone MP, Cho YJ, Huang H, Kim HY, Kozekov ID, Kozekova A, Wang H, Minko IG, Lloyd RS, Harris TM, Rizzo CJ* (2008) Interstrand DNA cross-links induced by alpha, beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. *Acc Chem Res* 41: 793–804.
<https://doi.org/10.1021/ar700246x>
16. *Cadet J, Davies KJA, Medeiros MH, Di Mascio P, Wagner JR* (2017) Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic Biol Med* 107: 13–34.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049>
17. *Adikesavan AK, Barrios R, Jaiswal AK* (2007) *In vivo* role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in metabolic activation of mitomycin C and bone marrow cytotoxicity. *Cancer Res* 67(17): 7966–7971.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472>
18. *Cammerer Z, Elhajouji A, Suter W* (2007) *In vivo* micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals. *Mutat Res* 626: 26–33.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.004>
19. *Asanov MA, Sinitsky MY, Shishkova DK, Sinitskaya AV, Khutornaya MV, Poddubnyak AO, Ponasenko AV* (2023) Dose-Response Assessment of Mitomycin C Genotoxic Effect on ApoE Knockout Mice. *J Evol Biochem Physiol* 59: 1693–1699.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023050198>
20. *Schmid W* (1973) Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. *Agents Actions* 3: 77–85.
<https://doi.org/10.1007/BF01986538>
21. *Jain AK, Pandey AK* (2019) *In Vivo* Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow. *Methods Mol Biol* 2031: 135–146.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9_7
22. *Kutikhin AG, Shishkova DK, Velikanova EA, Sinitsky MY, Sinitskaya AV, Markova VE* (2022) Endothelial dysfunction in the context of blood-brain barrier modeling. *J Evol Biochem Physiol* 58: 781–806.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022030139>

23. *Nam D, Ni CW, Rezvan A, Suo J, Budzyn K, Llanos A, Harrison D, Giddens D, Jo H* (2009) Partial carotid ligation is a model of acutely induced disturbed flow, leading to rapid endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1535–H1543.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00510.2009>
24. *Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, De Paepe A, Speleman F* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7): research0034.1.
<https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
25. *Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT* (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
26. *O’Riordan E, Chen J, Brodsky SV, Smirnova I, Li H, Goligorsky MS* (2005) Endothelial cell dysfunction: the syndrome in making. *Kidney Int* 67(5): 1654–1658.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00256.x>
27. *Chen PY, Qin L, Baeyens N, Li G, Afolabi T, Budatha M, Tellides G, Schwartz MA, Simons M* (2015) Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *J Clin Invest* 125(12): 4514–4528.
<https://doi.org/10.1172/JCI82719>
28. *Cahill PA, Redmond EM* (2016) Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis* 248: 97–109.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>
29. *Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G* (2016) Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 118(4): 620–636.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>
30. *Souilhol C, Harmsen MC, Evans PC, Krenning G* (2018) Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 114(4): 565–577.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvx253>
31. *Hartman J, Frishman WH* (2014) Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol Rev* 22: 147–151.
<https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000021>
32. *Jensen HA, Mehta JL* (2016) Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 14: 1021–1033.
<https://doi.org/10.1080/14779072.2016.1207527>
33. *Sabatel H, Pirlot C, Piette J, Habraken Y* (2011) Importance of PIKKs in NF- κ B activation by genotoxic stress. *Biochem Pharmacol* 82: 1371–1383.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.105>
34. *Habraken Y, Piette J* (2006) NF- κ B activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol* 72: 1132–1141.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.015>
35. *Janssens S, Tschopp J* (2006) Signals from within: the DNA-damage-induced NF- κ B response. *Cell Death Differ* 13: 773–784.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401843>
36. *Ahmed KM, Li JJ* (2007) ATM-NF- κ B connection as a target for tumor radiosensitization. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 335–342.
<https://doi.org/10.2174/156800907780809769>
37. *Wu ZH, Miyamoto S* (2007) Many faces of NF- κ B signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med (Berl)* 85: 1187–1202.
<https://doi.org/10.1007/s00109-007-0227-9>
38. *Chou SF, Chang SW, Chuang JL* (2007) Mitomycin C upregulates IL-8 and MCP-1 chemokine expression via mitogen-activated protein kinases in corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 2009–2016.
<https://doi.org/10.1167/iovs.06-0835>
39. *Cohen I, Rider P, Vornov E, Tomas M, Tudor C, Wegner M, Brondani L, Freudenberg M, Mittler G, Ferrando-May E, Dinarello CA, Apte RN, Schneider R* (2015) IL-1 α is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity. *Sci Rep* 5: 14756.
<https://doi.org/10.1038/srep14756>

40. *Cohen I* (2016) DNA damage talks to inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 33: 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.11.002>
41. *Poliezhhaieva T, Ermolaeva MA* (2017) DNA damage in protective and adverse inflammatory responses: Friend of foe? *Mech Ageing Dev* 165(Pt A): 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.06.004>
42. *Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH* (1999) A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190: 1375–1382. <https://doi.org/10.1084/jem.190.10.1375>
43. *Fingerle-Rowson G, Petrenko O* (2007) MIF coordinates the cell cycle with DNA damage checkpoints. Lessons from knockout mouse models. *Cell Div* 2: 22. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-22>
44. *Nemajerova A, Mena P, Fingerle-Rowson G, Moll UM, Petrenko O* (2007) Impaired DNA damage checkpoint response in MIF-deficient mice. *EMBO J* 26: 987–997. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601564>
45. *Nemajerova A, Moll UM, Petrenko O, Fingerle-Rowson G* (2007) Macrophage migration inhibitory factor coordinates DNA damage response with the proteasomal control of the cell cycle. *Cell Cycle* 6: 1030–1034. <https://doi.org/10.4161/cc.6.9.4163>
46. *Parmar KM, Larman HB, Dai G, Zhang Y, Wang ET, Moorthy SN, Kratz JR, Lin Z, Jain MK, Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G* (2006) Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest* 116: 49–58. <https://doi.org/10.1172/JCI24787>
47. *Zakkar M, Van der Heiden K, Luong le A, Chaudhury H, Cuhlmann S, Hamdulay SS, Krams R, Edirisinghe I, Rahman I, Carlsen H, Haskard DO, Mason JC, Evans PC* (2009) Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1851–1857. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.193375>
48. *Zhou G, Hamik A, Nayak L, Tian H, Shi H, Lu Y, Sharma N, Liao X, Hale A, Boerboom L, Feaver RE, Gao H, Desai A, Schmaier A, Gerson SL, Wang Y, Atkins GB, Blackman BR, Simon DI, Jain MK* (2012) Endothelial Kruppel-like factor 4 protects against atherothrombosis in mice. *J Clin Invest* 122: 4727–4731. <https://doi.org/10.1172/JCI66056>
49. *Davies PF, Civelek M, Fang Y, Fleming I* (2013) The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovasc Res* 99: 315–327. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt101>
50. *Nakajima H, Mochizuki N* (2017) Flow pattern-dependent endothelial cell responses through transcriptional regulation. *Cell Cycle* 16: 1893–1901. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1364324>
51. *Lazaro I, Lopez-Sanz L, Bernal S, Oguiza A, Recio C, Melgar A, Jimenez-Castilla L, Egido J, Madrigal-Matute J, Gomez-Guerrero C* (2018) Nrf2 Activation Provides Atheroprotection in Diabetic Mice Through Concerted Upregulation of Antioxidant, Anti-inflammatory, and Autophagy Mechanisms. *Front Pharmacol* 9: 819. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00819>
52. *SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, Feinberg MW, Chen Z, Simon DI, Luscinskas FW, Michel TM, Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G, Jain MK* (2004) KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med* 199: 1305–1315. <https://doi.org/10.1084/jem.20031132>
53. *Dekker RJ, van Thienen JV, Rohlena J, de Jager SC, Elderkamp YW, Seppen J, de Vries CJ, Biessen EA, van Berkel TJ, Pannekoek H, Horrevoets AJ* (2005) Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. *Am J Pathol* 167: 609–618. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63002-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63002-7)
54. *Villarreal G Jr, Zhang Y, Larman HB, Gracia-Sancho J, Koo A, Garcia-Cardena G* (2010) Defining the regulation of KLF4 expression and its downstream transcriptional targets in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 984–989. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.002>
55. *Libby P, Luscher T* (2020) COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur Heart J* 41: 3038–3044. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa623>
56. *Fogarty H, Townsend L, Morrin H, Ahmad A, Comerford C, Karampini E, Englert H, Byrne M, Bergin C, O'Sullivan JM, Martin-Loeches I, Nadarajan P, Bannan C, Mallon PW, Curley GF, Preston RJS, Rehill AM, McGonagle D, Ni Cheallaigh C, Baker RI, Renne T, Ward SE,*

- O'Donnell JS, Irish COVID-19 Vasculopathy Study (iCVS) investigators* (2021) Persistent endotheliopathy in the pathogenesis of long COVID syndrome. *J Thromb Haemost* 19: 2546–2553.
<https://doi.org/10.1111/jth.15490>
57. *Gorog DA, Storey RF, Gurbel PA, Tantry US, Berger JS, Chan MY, Duerschmied D, Smyth SS, Parker WAE, Ajjan RA, Vilahur G, Badimon L, Berg JMT, Cate HT, Peyvandi F, Wang TT, Becker RC* (2022) Current and novel biomarkers of thrombotic risk in COVID-19: a Consensus Statement from the International COVID-19 Thrombosis Biomarkers Colloquium. *Nat Rev Cardiol* 19: 475–495.
<https://doi.org/10.1038/s41569-021-00665-7>

Genotoxic Stress is a Trigger of Endothelial Dysfunction in Wistar Rats: Results of a Molecular Genetic Study

**M. Yu. Sinitsky^{a,*}, A. V. Sinitskaya^a, M. V. Khutornaya^a, M. A. Asanov^a,
D. K. Shishkova^a, A. O. Poddubnyak^a, and A. V. Ponasenko^a**

^a*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia*

^{*}*e-mail: max-sinitsky@rambler.ru*

Atherosclerosis and coronary artery disease are the leading causes of disability and mortality among the population. Genotoxic stress can be considered as a new trigger of endothelial dysfunction underlying the pathogenesis of these diseases. This research was aimed to the study of molecular genetic markers of endothelial dysfunction associated with genotoxic stress in normolipidemic Wistar rats. Male Wistar rats that received tail vein injections of the alkylating mutagen mitomycin C (MMC) at the dosage of 0.5 mg/kg body weight (experimental group) or 0.9% NaCl solution (control group) three times a week for a month were included in the presented study. Genotoxic stress in animals was assessed using a micronucleus assay in polychromatophilic erythrocytes (PCE); endothelial dysfunction was identified by assessing the expression of the *Vcam1*, *Icam1*, *Sele*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Mif*, *Vwf*, *Serpine1*, *Plau*, *Plat*, *Klf2*, *Klf4*, *Nfe2l2*, *Nos3*, *Snai1*, *Snai2*, *Twist1*, *Zeb1*, *Cdh5* and *Cdh2* genes in the endothelial monolayer of the descending aorta. It was found that rats from the experimental group are characterized by pronounced genotoxic stress, as evidenced by a more than threefold increased frequency of micronucleated PCE and a decreased proportion of PCE in the total pool of analyzed erythrocytes. Gene expression profiling showed that rats included in the experimental group are characterized by pro-inflammatory activation of endothelium, accompanied by increased expression of the *Vcam1*, *Icam1*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2* and *Cxcl1* genes, as well as impaired endothelial mechanotransduction, characterized by decreased expression of the *Klf2* and *Klf4* genes. Thus, MMC-induced genotoxic stress in normolipidemic Wistar rats is associated with impaired two key links of the pathogenesis of endothelial dysfunction and can be considered as one of its triggers.

Keywords: DNA damage, mutagenesis, atherogenesis, endothelium, micronucleus assay, gene expression, mRNA