

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 110 № 6

июнь
2024



НАУКА

— 1727 —



СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Барберинг у лабораторных грызунов: проблемы и перспективы его изучения
М. М. Котова, В. Д. Рига, А. В. Калусев 867
- Анализ груминга грызунов и его поведенческой микроструктуры в современных нейробиологических исследованиях
К. В. Апухтин, А. Д. Шевляков, М. М. Котова, С. В. Амикишиев, В. Д. Рига, А. Д. Волгин, А. В. Калусев 889
-

Экспериментальные статьи

- Исследование Na^+/K^+ -АТФазы и компонентов Ca^{2+} -транспортирующей системы в миокарде в условиях экспериментального преддиабета и диабета 1-го типа у крыс
И. Б. Сухов, О. В. Чистякова, М. Г. Добрецов 915
- Влияние гонадотропной стимуляции яичников в условиях хронического психосоциального стресса на качество ооцитов мышей
Д. А. Лебедева, Т. Н. Игонина, Е. Ю. Брусенцев, Н. А. Шавшаева, С. Я. Амстиславский 930
- Влияние дигидрокверцетина на интенсивность оксидативного стресса в митохондриях печени крыс при гипотермии
Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, З. Г. Рабаданова, М. Б. Джафаров 945
- Особенности пространственно-временной структуры мышечных синергий при реализации профилирующих элементов в художественной гимнастике
С. А. Моисеев, С. М. Иванов 959
- Влияние интраназально вводимого инсулина на метаболические показатели и факторы воспаления у контрольных и диабетических крыс в условиях церебральной ишемии и реперфузии
И. И. Зорина, А. С. Печальнова, Е. Е. Черненко, К. В. Деркач, А. О. Шпаков 976
- Влияние грелина на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра крысы
А. Н. Инюшкин, А. Ю. Шарафутдинова, Е. М. Инюшкина, А. А. Инюшкин 994
- Прекодиционирование умеренной гипоксией повышает толерантность к последующей тяжелой гипоксии у крыс с ЛПС-индуцированной эндотоксемией
Ж. А. Донина 1009
- Влияние биополимеров и функционализированных ими микрочастиц ватерита на агрегацию тромбоцитов
Д. В. Григорьева, Е. В. Михальчик, Н. Г. Балабушевич, Д. В. Мосиевич, М. А. Мурина, О. М. Панасенко, А. В. Соколов, И. В. Горудко 1020
- Сравнение влияния антидепрессантов имипрамина и флуоксетина на цикл сон – бодрствование и сонные веретена у крыс линии WAG/Rij с абсансной эпилепсией и коморбидной депрессией
А. В. Габова, Е. А. Федосова, К. Ю. Саркисова 1037
-

CONTENTS

Reviews

- Barbering in Laboratory Rodents: Problems and Prospects
M. M. Kotova, V.D. Riga, and A.V. Kalueff 867
- Analyses of Rodent Grooming and Its Behavioral Microstructure
K. V. Apukhtin, A. D. Shevlyakov, M. M. Kotova, S. V. Amikishiev, V. D. Riga, A. D. Volgin, and A. V. Kalueff 889
-

Experimental articles

- Study of Na⁺/K⁺-ATPase and Components of the Ca²⁺-transporting System in Myocardium under Experimental Prediabetes and Type 1 Diabetes in Rats
I. B. Sukhov, O. V. Chistyakova, and M. G. Dobretsov 915
- Effects of Ovarian Stimulation with Gonadotropins in the Conditions of Chronic Psychosocial Stress on the Quality of Murine Oocyte
D. A. Lebedeva, T. N. Igonina, E. Yu. Brusentsev, N. A. Shavshaeva, and S. Ya. Amstislavsky 930
- Effects of Dihydroquercetin on the Intensity of Oxydative Stress in Rat Liver Mitochondria at Hypothermia
R. A. Khalilov, A. M. Dzhafarova, Z. G. Rabadanova, and M. B. Dzhafarov 945
- Spatial-Temporal Structure Features of Muscle Synergies During Profiling Elements Implementation in Rhythmic Gymnastics
S. A. Moiseev, and S. M. Ivanov 959
- Effect of Intranasally Administered Insulin on Metabolic Parameters and Inflammation Factors in Control and Diabetic Rats under Conditions of Cerebral Ischemia and Reperfusion
I. I. Zorina, A. S. Pechalnova, E. E. Chernenko, K. V. Derkach, and A. O. Shpakov 976
- The Effects of Ghrelin on Spike Activity of the Suprachiasmatic Nucleus Neurones of the Rat
A. N. Inyushkin, A. Yu. Sharafutdinova, E. M. Inyushkina, and A. A. Inyushkin 994
- Preconditioning with Moderate Hypoxia Increases Tolerance to Subsequent Severe Hypoxia in Rats with LPS-Induced Endotoxemia
Zh. A. Donina 1009
- Effect of Biopolymers and Functionalized by Them Vaterite Microparticles on Platelet Aggregation
D. V. Grigorieva, E. V. Mikhalkhik, N. G. Balabushevich, D. V. Mosievich, M. A. Murina, O. M. Panasenko, A. V. Sokolov, and I. V. Gorudko 1020
- Spindles in WAG/Rij Rats with Absence Epilepsy and Comorbid Depression
A. V. Gabova, E. A. Fedosova, and K. Yu. Sarkisova 1037
-
-

ОБЗОРЫ

**БАРБЕРИНГ У ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ: ПРОБЛЕМЫ
И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИЗУЧЕНИЯ**

© 2024 г. М. М. Котова¹, В. Д. Рига¹, А. В. Калуев^{1, 2, 3, *}

¹Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус»,
Федеральная территория Сириус, Россия

²Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный
университет, Санкт-Петербург, Россия

³Институт экспериментальной медицины, Национальный медицинский исследовательский
центр им. В. А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 20.01.2024 г.

После доработки 23.02.2024 г.

Принята к публикации 14.05.2024 г.

Барберинг представляет собой поведенчески обусловленную алопецию (выкусывание шерсти и вибрисс), часто наблюдаемую у лабораторных грызунов. В научной литературе активно обсуждается биологическая роль и взаимосвязь барберинга со стрессом, агрессией, грумингом и аберрантным стереотипным поведением. В работе рассмотрены новейшие данные по нейробиологии, генетике и фармакологии барберинга, а также его влияния на поведение и ЦНС грызунов. Понимание природы барберинга и его влияния на состояние лабораторных животных является важным фактором, который необходимо учитывать в экспериментальной работе.

Ключевые слова: барберинг, мыши, груминг, крысы

DOI: 10.31857/S0869813924060011, **EDN:** BFFOMT

ВВЕДЕНИЕ

Барберинг – поведенчески обусловленная потеря (выкусывание) шерсти и вибрисс, несвязанная с дерматологическими заболеваниями и часто наблюдаемая в популяциях лабораторных грызунов [1–4]. Представляя собой целый спектр паттернов потери шерсти (табл. 1, рис. 1), барберинг широко распространен у лабораторных мышей [2], крыс [5], кроликов [6–8], шиншиллы и других видов животных [9]. Поскольку подавляющее число работ по данной тематике посвящено барберингу у грызунов, особенно у мышей как у наиболее распространённого объекта биологических исследований, настоящий обзор сосредоточен на рассмотрении барберинга у лабораторных мышей и крыс. Впервые данный эффект был описан как «поедание вибрисс», и поэтому в более ранних работах можно найти термины whisker-eating или fur trimming [1]. Иные встречающиеся в научной литературе названия данному феномену включают эффект Далилы, hair-nibbling, hair-trimming, devibrissation, snout denuding и др. [1, 2–4].

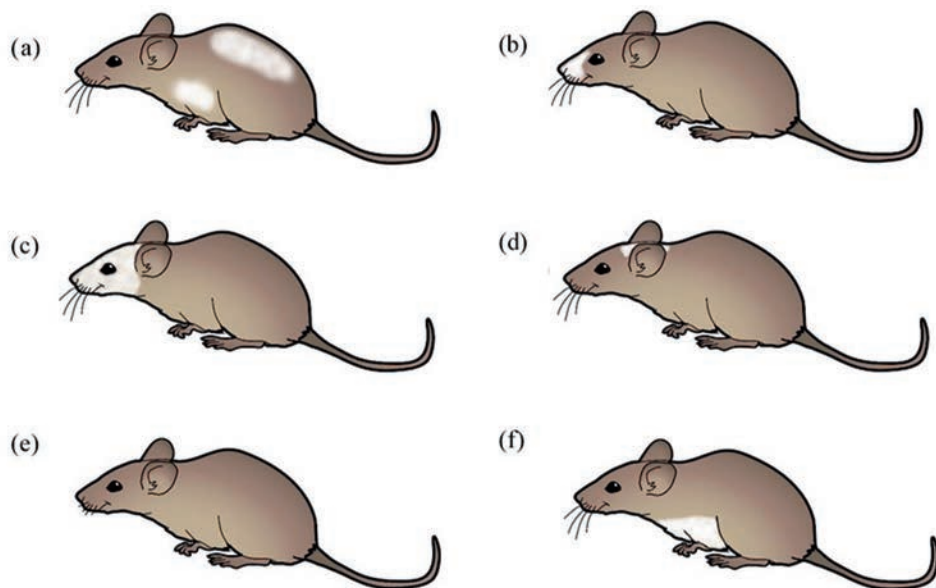


Рис. 1. Схематичное изображение типичных форм барберинга у лабораторных мышей (также см. табл. 1): (a) – барберинг на голове у мышей линии C57Bl/6, (b) – барберинг морды у мышей линии NMRI, (c) – сильный барберинг всей головы у мышей линии 129/SvJ, (d) – барберинг между ушами у мышей линии 129S1, (e) – обкусывание вибрисс у мышей линии A/J, (f) – материнский барберинг живота у мышей линии 129S1. Диаграмма приводит типичную локализацию барберинга, степень его выраженности может сильно варьировать среди особей одной линии.

Наибольшее значение у лабораторных грызунов имеет гетеро-барберинг, в реализации которого участвует несколько особей, и обычно (хотя в разной степени) затрагивает всех особей в клетке. Такой барберинг связан с механизмами установления социальной иерархии [1], поскольку особь-барбер зачастую является доминантной при совместном содержании [1–3], наступая на субординантную особь лапами и удерживая ее во время барберинга [4]. Барберинг зависит от линии и возраста животных и чаще встречается у самок, проявляясь в виде выкусывания шерсти на голове и спине, в также в срезании вибрисс [1–4] (табл. 1, рис. 1). Интересно при гетеро-барберинге добровольное поведение со стороны реципиента, поскольку даже при наличии решетки между особями барберинг продолжается, что возможно только в случае добровольного подхода реципиента [1]. Тем не менее барберинг встречается и при одиночном содержании (ауто-барберинг), проявляясь в виде выкусывания собственной шерсти в доступных местах – например, с поверхности живота, груди, гениталий, боков и задних конечностей [1]. Систематический анализ барберинга в большой колонии около 3000 мышей показал встречаемость ауто-барберинга на уровне 6% среди индивидуально содержащихся мышей, и в 10 раз меньше среди мышей, содержащихся группами [10]. При этом уровень гетеро-барберинга у последних был около 7.5%, особенно часто встречаясь у самок. Анализ колонии мышей линии A2G демонстрирует встречаемость барберинга на уровне 75% от общего числа клеток с животными в возрасте 2 месяцев [11]. Почти во всех клетках с самцами или самками мышей линии NMRI также обнаружен выраженный барберинг (собственные наблюдения, 2003–2006 гг.). Таким образом, барберинг является широко распространённым поведением лабораторных грызунов в условиях современных вивариев (табл. 1).

Таблица 1. Примеры разновидностей барберинга у лабораторных мышей (также см. рис. 1)

Описание	Линия	Ссылка
<i>Гетеро-барберинг</i>		
Обкусывание, вырывание вибрисс	A/J	[2]
Полное выбривание вибрисс	NMRI, C57Bl/6, BALB/cJ, A2G	[1, 2, 11]
Выбривание шерсти вокруг глаз	C57Bl/6, C57Bl/6–129SvJ	[1, 2]
Выбривание шерсти между ушей	C57Bl/6, C57Bl/6–129S1, C57Bl/6–129SvJ	[2]
Выбривание шерсти на морде	NMRI	[2]
Выбривание шерсти на теле	C57Bl/6, C57Bl/6–129S1, C57Bl/6–129SvJ	[2]
Материнский барберинг (в области гениталий и живота)	C57Bl/6, 129S1	[2]
Сексуальный барберинг (самки самцам)	129S1, C57Bl/6	[3]
<i>Ауто-барберинг</i>		
Алопеция на груди, животе, боках	C57Bl/6J, C57Bl/6J-+/Ay	[10]

Как и у мышей, барберинг широко представлен у лабораторных крыс [5, 12, 13, 14]. Например, при действии хронического 10-дневного стресса наблюдается ухудшение общего состояния животных, их шерстяной покров выглядит неопрятно, и отмечается частый ауто- и гетеро-барберинг, в результате которого на шерстяном покрове крыс возникают участки очаговой алопеции (чаще на мордочке вокруг носа, боках и дорзальной поверхности шеи, у некоторых особей была выгрызена часть вибрисс) на фоне повышенной вокализации, локомоторного возбуждения, принятия оборонительных и агрессивных поз, а также агрессивных атак на решетки клеток и экспериментатора [14]. Кроме того, как и у мышей, у крыс описан материнский барберинг, при котором детеныши осуществляли стрижку по отношению к кормящей самке [15]. Интересно также, что описан и межвидовой барберинг (например, когда мыши при совместном содержании осуществляли барберинг крыс [10]), хотя такие случаи встречаются крайне редко, поскольку совместное содержание является нарушением правил содержания лабораторных грызунов.

На практике барберинг у грызунов нередко игнорируют при проведении экспериментальной работы [2, 3, 11], даже если в ряде случаев он может серьезно отразиться на результатах исследований (см. далее). Вероятно, это происходит из-за недостаточной изученности данного поведенческого фенотипа, в том числе на фоне как относительного небольшого числа самих работ по данной теме, так и отсутствия заметного роста интереса к нему в последние годы. В частности, начиная с 1983 г. по март 2024 г. в базе данных Pubmed можно найти всего 33 работы по данной тематике (рис. 2), тогда как поведение груминга у мышей упоминается более чем в 1600 работах, а общее количество работ, посвященных поведению мышей, превышает 200000. Отражая неадекватность данного положения дел, настоящий обзор посвящен обсуждению новейших данных по нейробиологии барберинга, его фенотипов, проявлениях на фоне различных экспериментальных манипуляций, а также важности данного феномена как составляющей различных патологических состояний организма грызунов.

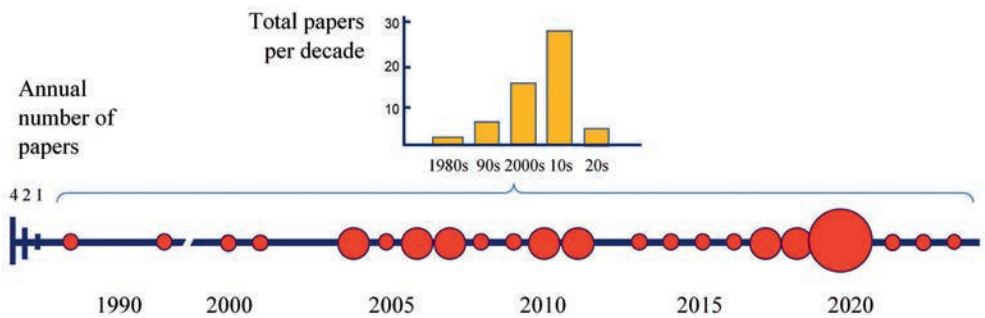


Рис. 2. Временная динамика исследовательских работ в области барберинга грызунов, представленных в базе данных Pubmed на март 2024 г. Радиус отражает количество работ за определённый год, включая обзорные и экспериментальные работы. Следует отметить, что пик публикаций по теме приходится на последние две декады, когда происходила стандартизация экспериментальных доклинических протоколов по лабораторным грызунам, и произошел всплеск генно-модифицированных животных, чьи поведенческие и физиологические характеристики подробно изучались.

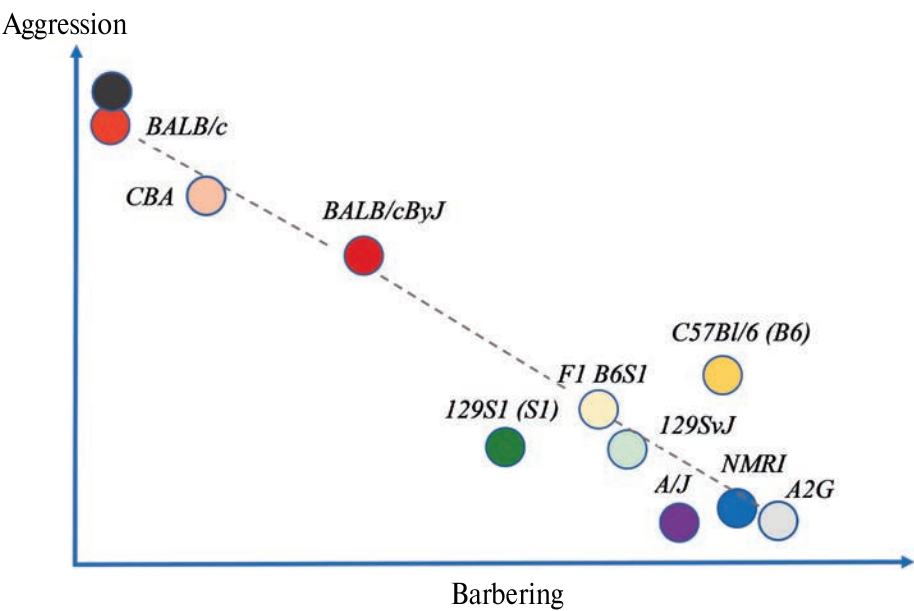


Рис 3. Схематичное распределение линий мышей в зависимости от условного уровня их агрессивности и относительной выраженности барберинга (см. также рис. 1 и табл. 3) [2, 10, 16].

БАРБЕРИНГ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МАНИПУЛЯЦИЯХ

Барберинг демонстрирует чувствительность к различным генетическим факторам. Например, он различается у мышей разных линий (рис. 3), активно проявляясь у самцов и самок линий NMRI и гибридов C57BL6–129S1 (B6S1) [2]. Так как данные линии известны как неагрессивные, вероятно, барберинг у них служит замещением агрессии, что подтверждается также отсутствием барберинга у агрессивных мышей BALB/c [2]. При этом, однако, для близкородственной, но менее агрессивной, линии мышей BALB/cByJ проявление барберинга характерно [16], что также согласуется с отмеченной выше связью барберинга и общим уровнем агрессивности животных (рис. 3). Аналогично, агрессивные мыши линии CBA демонстрируют барберинг в 10 раз реже, чем неагрессивные мыши линии C57Bl/6 [10]. Отсутствие барберинга у мышей является доминантным признаком, что показано при скрещивании мышей линии BALB/c (с практически отсутствующим барберингом) с мышами линии 129S1 (у которых он наблюдается), и отсутствием барберинга в однополых группах у гибридов F1 [16]. При этом барберинг встречается как у инбредных, так и аутбредных линий мышей (табл. 1), подчеркивая популяционное значение данного фенотипа. Интересная форма барберинга наблюдается у мышей линий 129S1 и C57B6, демонстрирующих так называемый материнский барберинг (табл. 1), который осуществляют детеныши по отношению к матерям, и заключающийся в выбривании шерсти на их животе в период выкармливания [2].

Уровень барберинга животных также зависит от возраста и условия содержания [1–4, 11]. Например, барберинг вибрисс отсутствует у 100% двухмесячных мышей гибридной линии B6CBA, но составляет около 30–40% к 6- и 10-месячному возрасту [17]. У самок линии C57Bl/6J барберинг начинает проявляться к 13–14-й неделе жизни, и его уровень зависит от состояния гигиены в домашней клетке (снижаясь при сохранении грязной подстилки) [18]. Возможно, экскременты и моча мышей содержат сигнальные молекулы, содержащие информацию о социальном статусе животных и снижающие барберинг [18]. На уровень барберинга влияют и другие факторы содержания животных в виварии – в частности, высота размещения клеток в лаборатории, их материал [19], а также плотность содержания животных в клетке [20]. При ее увеличении в домашних клетках вивария у мышей линии BALB увеличивается уровень барберинга у самок, и он начинает проявляться у самцов [20]. Помимо усиления барберинга и замедления роста животных, с ухудшением среды содержания возрастает также уровень тревоги и концентрация фекальных метаболитов кортикостерона, что свидетельствует о состоянии стресса у лабораторных животных с барберингом [20].

Сам уровень стресса и активность глюкокортикоидной гормональной оси также связаны с барберингом. Например, при абляции глюкокортикоидных рецепторов в заднем мозге у геномодифицированных мышей линии *Cyp11a1*, наряду с нарушением функционирования нейроэндокринной оси, дисфункции коры надпочечников и ростом уровня кортикостерона, наблюдается рост барберинга (табл. 1) и компульсивности на фоне снижения исследовательского поведения [21]. На уровень барберинга также влияет диета лабораторных животных. Например, кормление мышей линии C57Bl/6 диетой, повышающей уровень серотонина в мозге (пониженное содержание белка и повышенное содержание предшественника серотонина L-триптофана), увеличивает проявление барберинга [22].

Интересно, что барберинг у лабораторных грызунов можно не только повысить, но и снизить или даже предотвратить в экспериментальных условиях. Например, обогащение среды содержания снижает барберинг у мышей линии C57Bl/6J, а также у кроликов [6, 7]. Кроме того, снижение барберинга можно обнаружить при обеспечении мышей линии C57Bl/6NCrl гнездовым материалом, что стимулирует построение гнезда на фоне снижения агрессивного поведения и барберинга [23]. Однако важным

фактором здесь является тип и рассредоточение гнездового материала: при использовании бумажных полосок, равномерно распределенных по клетке, барберинг продолжает наблюдаться, тогда как при использовании «шайбы» из сгруппированных бумажных полос – исчезает [23].

Интересным аспектом для анализа барберинга является его корреляция с поведением лабораторных грызунов в других тестах, прежде всего на социальную иерархию. Наиболее сильная такая корреляция выявлена для теста социального доминирования в трубке, например, у мышей линии A2G [11, 24]. В данном тесте создается ненасильственная конфликтная ситуация, когда двух грызунов запускают с противоположных концов в узкую трубку, в результате чего они встречаются посередине, и особь, постоянно вынуждающая соперника отступать, считается доминантной [1]. Чаще всего считается, что доминантными по результатам теста трубки оказываются особи, которые осуществляют барберинг по отношению к сородичам [1]. С другой стороны, мыши линии C57Bl/6J, занимающие более высокое положение в социальной иерархии (судя по сниженному уровню барберинга в клетке), не всегда являются доминантными по результатам теста с трубкой [25]. По другим данным [1], у самцов мышей линии C57Bl/6 в тесте трубки отсутствует зависимость между вероятностью победы и наличием или отсутствием вибрисс в результате барберинга. Возможно, однако, что эти различия связаны с процедурными особенностями проведения теста с трубкой разными лабораториями [25], а также линейными и половыми различиями в релевантных доменах поведения [1].

БАРБЕРИНГ В ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ

Генетические модели

Как уже отмечалось, барберинг крайне чувствителен к различным генетическим манипуляциям, в том числе мутациям и трансгенезу (табл. 2). Подробный перечень линий генетически модифицированных мышей с нарушением барберинга содержится в Базе данных по геномной информатике мышей (Mouse Genomics Informatics Database) (<https://www.informatics.jax.org/>), поддерживаемой и курируемой Джексонской лабораторией (США). Например, описано влияние на барберинг со стороны системы нейростероидного гормона витамина Д, поскольку у мутантных мышей с генетической аблацией ядерного рецептора витамина Д отмечается аномальное социальное поведение, а также снижение барберинга [26].

Немаловажен также анализ барберинга у генетически модифицированных грызунов в контексте специфических вызываемых патологий ЦНС. Например, барберинг снижен у мышей линии 3xTg-AD, которая имитирует поздние стадии нейродегенераций с характерными патологиями бета-амилоида и тау-белка, являясь экспериментальной моделью болезни Альцгеймера [27]. Снижение барберинга у самок мышей 3xTg-AD может использоваться как социальный маркер в модели болезни Альцгеймера у мышей, легко регистрируемый без инвазивного вмешательства [27]. Данный фенотип, наряду со снижением тревожности, у трансгенных мышей линии 3xTg-AD отмечается на фоне потери тормозных нейронов, ассоциированных с вибриссами [28].

Атипичский барберинг также наблюдается у мышей с нокаутом гена *Dvl*, который кодирует белок *dishevelled*, вовлеченный в путь развития *wingless/Wnt* [29]. Мыши с дефицитом этого белка жизнеспособны и фертильны, однако демонстрируют нарушение социального поведения (снижение количества социальных взаимодействий) по сравнению с контролем линии 129/SvEv, являясь доминантными особями (в тесте трубки) со сниженным уровнем барберинга, однако при содержании совместно с контролем сами, наоборот, ему подвергаются [29].

У гетерозиготных мышей с дефицитом гена *Atp1a3*, кодирующего альфа-субъединицу Na/K-АТФазы в нейронах мозга, наблюдается ряд неврологических расстройств, включая паркинсонизм, альтернирующую гемиплегию детства, мозжечковую атаксию, арефлексию, атрофию зрительного нерва и синдром потери слуха [30]. Гетерозиготная линия мышей-мутантов по данному гену демонстрирует изменение в нейротрансмиссии (усиление торможения в коре мозжечка), нарушение двигательной функции после воздействия стрессоров, а также снижение уровня барберинга и социального взаимодействия на фоне неизменной агрессии и формирования социальной иерархии [30].

Исследование барберинга также важно в контексте патологического репетитивного поведения в лабораторных условиях вивария и моделирования на животных обсессивно-компульсивного расстройства (ОКР). Например, у гетеро- и гомозиготных мышей-нокаут по гену *Btdb3* (кодирующему белок 3, содержащий домен ВТВ/POZ (VTBD3) – фактор транскрипции, критичный для развития первичной сенсорной коры мозга), наблюдается увеличение барберинга на фоне роста двигательной активности и нарушения целенаправленного поведения [31]. При этом введение антидепрессантов, стандартно используемых при терапии ОКР в клинике, например, селективного ингибитора обратного захвата серотонина (СИОЗС) флуоксетина в течение 14 недель, нормализует (снижает) барберинг, причем корректирующий эффект проявлялся только у гетерозиготных животных [31].

Помимо генетической компоненты, на уровень патологического барберинга у лабораторных животных может влиять также их гормональный статус. Так, компульсивное поведение самцов мышей линии *ArKO* с нокаутом по гену ароматазы, сопровождаемое высоким уровнем барберинга, ассоциируется со снижением катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ) в лобной коре, гипоталамусе и печени. КОМТ осуществляет превращение андрогена в эстроген, и поэтому компульсивное поведение и барберинг связаны с дефицитом эстрогена, что также подтверждается возвращением данного поведения к норме после терапии 17-бета-эстрадиолом [32]. Еще один пример влияния гормонального статуса наблюдается у мышей с нокаутом гена *GalNac-4-ST1*, кодирующего сульфотрансферазу, которая осуществляет присоединение N-ацетилгалактозаминовой группы к лютеинизирующему гормону, обеспечивая его выведение из крови. У самцов нокаут данного гена приводит к росту уровня тестостерона, и, в итоге, к увеличению барберинга на фоне преждевременного полового созревания [33]. Эти наблюдения указывают на возможную важную роль половых гормонов в регуляции барберинга у грызунов.

Повышен уровень барберинга также у мышей с нокаутом *AChE*, гена ацетилхолинэстеразы – фермента, который расщепляет ацетилхолин и является фактором клеточной адгезии при разрастании нейритов. Такие мыши проживают более 2 недель в случае подбора специальной диеты с повышенным содержанием жиров и при этом демонстрируют выраженный барберинг на фоне сниженной агрессивности [34]. В регуляцию барберинга также, по-видимому, вовлечена индуцибельная синтаза оксида азота NO (NOS2). В частности, у мышей с нокаутом гена *NOS2* наблюдается аномально высокий уровень барберинга, по-видимому, вызванный дефицитом торможения в ЦНС в силу участия NOS2 в регуляции уровня глутамата [35]. Эти данные указывают на возможное вовлечение холин- и глутаматергических механизмов в регуляцию барберинга.

Аномальный барберинг также наблюдается у линии мышей с генетическим нокаутом *ELA2* (гена эластазы-2, которая, предположительно, осуществляет альтернативный путь выработки ангиотензина II и способствует расщеплению мозгового нейротрофина BDNF) [36]. У данной линии мышей повышены уровни барберинга, тревожности и компульсивного поведения в тесте закапывания шариков [36]. В целом является логичным наличие в литературе большого количества работ по изучению барберинга в моделях компульсивного поведения, так как барберинг является экстремальной формой груминга, который сам по себе является симптомом ОКР в животных моделях

[37]. С другой стороны, существует мнение, что аномальный барберинг лабораторных грызунов нельзя считать полноценной моделью ОКР из-за отсутствия лимбических биомаркеров, которые характерны для данной патологии в клинике [38].

Еще один поведенческий контекст, в рамках которого изучалась роль барберинга у грызунов, – это экспериментальные психозы (модели шизофрении на животных). Известно, например, что у пациентов с шизофренией в ряде областей мозга понижен уровень фосфолипазы C (PLC)бета1. У мышей с нокаутом по гену *PLCбета1* наблюдается гиперактивность, измененное социальное поведение и отсутствие барберинга [39]. Данное наблюдение подтверждает точку зрения о том, что барберинг грызунов является важным фенотипом, отсутствие которого в лабораторных условиях может быть также патологично, как и сверхвыраженность.

Таблица 2. Изменение уровня барберинга в различных патофизиологических моделях

Патофизиологическая модель	Линия*	Изменение барберинга	Ссылка
Абляция ядерного рецептора витамина Д	129S1	Снижение барберинга	[26]
Линия 3xTg-AD – генетическая модель болезни Альцгеймера	C57Bl/6J (B6)×129 sv [27], B6SJLF1 [28].	Снижение барберинга	[27–28]
Нокаут гена <i>Dvl</i> , вовлеченного в путь развития wingless/Wnt	129/SvEv	Снижение барберинга	[29]
Дефицит гена <i>Atpla3</i> , кодирующего альфа-субъединицу Na/K-АТФазы	C57Bl/6J (B6)	Снижение барберинга	[30]
Нокаут гена <i>Btbd3</i> , кодирующего белок 3 с доменом ВТВ/POZ (BTBD3) – генетическая модель ОКР	129/B6	Увеличение барберинга	[31]
Линия <i>ArKO</i> с нокаутом гена ароматазы	C57Bl/6J X J129	Увеличение барберинга	[32]
Нокаут гена <i>GalNAc-4-ST1</i> , кодирующего сульфотрансферазу	C57Bl/6J	Увеличение барберинга	[33]
Нокаут гена ацетилхолинэстеразы	129Sv	Увеличение барберинга	[34]
Нокаут гена индуцибельной NO-синтазы	C57Bl/6J	Увеличение барберинга	[35]
Нокаут гена эластазы-2	C57Bl/6J	Увеличение барберинга	[36]
Нокаут гена фосфолипазы C (PLC) бета1	C57Bl/6J× 129S4/SvJae	Отсутствие барберинга	[39]

* там, где указано в оригинальных публикациях, в таблице приводится источник происхождения линии.

Другие модели

Поскольку барберинг лабораторных грызунов рассматривается в качестве потенциального биомаркера различных патологий ЦНС, его важно учитывать при работе с лабораторными животными. Например, мыши, живущие в группе с барбером (чаще всего доминантной особью, которая «обривает» других особей в клетке), часто лишаются в первую очередь вибрисс, подвергаясь сенсорной депривации [1]. Известно, что девибриссация изменяет поведение мышей, что может напрямую отразиться на их исследовательской активности и соответственно исказить интерпретацию результатов эксперимента. Например, девибриссация является экспериментальной моделью анксиогенеза у грызунов и приводит к нарушению их исследовательского поведения [39]. Поэтому девибриссация при барберинге (рис. 1) может усилить тревогу у подвергнутых ему особей в поведенческих тестах, неспецифически влияя на результаты исследований.

С другой стороны, барберинг вибрисс может привести к невозможности обнаружения животным «открытой» (т.е. незащищенной, потенциально более опасной за счет отсутствия укрытий) части экспериментальных аппаратов в ряде тестов на тревогу, например, открытых рукавов крестообразного приподнятого лабиринта, что может привести к более «бесстрашному» поведению, которое на самом деле обусловлено не снижением тревоги как таковой, а невосприятием животным опасности в силу отсутствия сигналов от вибрисс. Более того, имеются данные о том, что поведение животных без вибрисс в различных поведенческих тестах может быть еще более сложным и нелинейным, чем просто повышение или снижение тревожности [1]. Например, если в тесте «открытое поле» у самцов мышей линии C57Bl/6N отсутствуют отличия в уровне тревожности и двигательной активности, то исследование незнакомых предметов оказывается меньше у мышей без вибрисс [1]. При этом в тесте Порсолта на выученную беспомощность (тест вынужденного плавания) отличия в поведении проявляются преимущественно в первые две минуты, и поведение избегания авersive условий более выражено у безусых мышей [1]. Таким образом, частичная сенсорная депривация мышей, связанная с поведением присутствующего в клетке барбера, приводит к изменению их исследовательского поведения в обстановке новизны [1]. Поэтому при выполнении поведенческих тестов перед включением животных в экспериментальную группу необходимо оценивать состояние их вибрисс, а также учитывать факт спонтанной девибриссации при проведении анализа и интерпретации полученных данных [1, 2]. Например, логичным решением может оказаться «выравнивание» сравниваемых группы по данному признаку или даже исключение особей с сильно выраженным барберингом из эксперимента, чтобы не повлиять на надежность и воспроизводимость полученных результатов. Последнее особенно важно на фоне растущей озабоченности научного сообщества проблемой воспроизводимости поведенческих данных [40, 41], поскольку один и тот же поведенческий профиль у грызунов может по-разному модулироваться в случае, если уровень спонтанного барберинга различается в двух лабораториях.

В ходе поведенческого тестирования лабораторных грызунов барберинг может существенно повлиять на результаты экспериментов не только в плане девибриссации как таковой, но и в других тестах. Например, выраженная алопеция у мышей на теле в результате барберинга (рис. 1) гипотетически может повлиять на общую плавучесть животных (в силу изменения свойств воздушной подушки их шерсти), таким образом отличаясь у мышей с алопецией относительно мышей без барберинга. Соответственно данный физический фактор может создать дополнительную физическую нагрузку на грызунов с выраженным барберингом всего тела, например, в тесте вынужденного отчаяния (плавание в тесте Порсолта) или водном лабиринте Морриса, и тем самым неспецифически исказить результаты тестирования.

Наконец, барберинг можно рассматривать в связке с грумингом, анализ которого может помочь обнаружить тонкие различия в разных сферах поведения, таких как моторика двигательной активности, тревожности и депрессии [42]. Регуляция груминга

опосредована работой целого ряда гормонов и нейромедиаторов [43, 44], и поэтому их изменение, например, в модели стресса, закономерно приводит к нарушению данного поведения. Например, при низком уровне стресса, груминг осуществляется в цефало-каудальной последовательности, начинаясь как умывание лап и морды, затем следуют двусторонние умывания головы, сменяющиеся вылизыванием тела, гениталий и хвоста [42]. При высоком уровне стресса груминг характеризуется хаотичной активностью, которая не подчиняется вышеописанной последовательности [42]. В настоящее время неясна зависимость барберинга от груминга, а также механизмы контроля перехода от одного поведения к другому (табл. 3). Например, неясно, являются ли данные формы поведения конкурентными, или одна может приводить к усилению другой.

В то же время, отмечая определенное сходство двух данных форм поведения, стоит отметить наличие автоматических методов оценки груминга (например, с использованием модуля программы Noldus EthoVision [45] или других аналогичных программ регистрации и распознавания поведения), по примеру которых возможно создать системы для автоматического распознавания и анализа барберинга (причем как в реальном времени в проводимых экспериментах, так и долговременно в условиях содержания в домашней клетке). Это может позволить проводить высокопроизводительное нейрофенотипирование данного поведенческого паттерна, который (в силу сложности поведения и редкости встречаемости вне домашней клетки) в настоящее время регистрировать крайне сложно.

Дополнительным шагом в этом направлении может стать автоматическая регистрация барберинга в самой домашней клетке. Например, для анализа поведения уже имеются системы длительной регистрации многочисленных параметров в условиях содержания грызунов [46], и их расширение за счет включения барберинга в список регистрируемого поведения представляется логичным и закономерным. Можно также ожидать, что анализ барберинга в будущем будет проводиться также не только на основе видеорегистрации, а на основании специфического вибрационного профиля, генерируемого при ауто- и гетеро-барберинге. Успешная разработка чувствительных систем, способных распознавать по вибрационным профилям различные формы груминга грызунов [47–49], указывает на принципиальную возможность применения данных подходов и к анализу барберинга. С учетом данных о наличии вокализаций грызунов в момент барберинга [4], его видеорегистрация или запись вибрационного спектра могут сопровождаться записью вокализаций животных, для более полного и контекст-специфического фенотипирования данного поведения. Наконец, следует особо отметить перспективность применения систем искусственного интеллекта для создания и обучения нейросетей (на основе сигналов видео- или вибрационной регистрации поведения) для распознавания и анализа барберинга лабораторных грызунов. Например, помимо детального анализа статистики и демографии барберинга в колонии грызунов, данный подход может ответить на вопросы о том, насколько груминг и барберинг коморбидны в одной колонии, и сколько особей в клетке (один барбер, он и несколько «помощников», или же несколько барберов) обривают других особей? В перспективе применение методов искусственного интеллекта также позволит этологически разделить ауто- и гетеро-барберинг в социальных группах и ответить на вопрос, как часто две данные разновидности барберинга могут затрагивать одну и ту же особь.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, барберинг является важным поведенческим биомаркером различных патологических состояний ЦНС. Тем не менее несмотря на феноменологическую общность, даже в сравнении с грумингом он отличается большим разнообразием форм вовлеченного поведения – например, включая выбривание, выдергивание или выкусывание вибрисс, а также выбривание и выкусывание шерсти на совершенно различных

участках тела грызуна (рис. 1). Насколько правомерно объединять такие разные формы поведения в одну категорию, чаще всего оцениваемую интегрально в эксперименте по степени выраженности алопеции или частоте ее встречаемости? Как отделить барберинг от повышенного груминга (*overgrooming*)? Более того, в силу меньшей представленности в поведении грызунов (по сравнению с грумингом) крайне мало известно о поведенческой микроструктуре барберинга [3]. Например, неизвестно, является ли данное поведение однородным, или оно (по аналогии с грумингом) также может иметь различные последовательные стадии внутри одного эпизода барберинговой активности.

Мало также изучена сама нейробиологическая природа взаимосвязи груминга и барберинга. В частности, неясно, может ли активация груминга послужить триггером и барберинга, и наоборот? Предшествует ли груминг барберингу, или наоборот? Какова роль индивидуальных различий в проявлении барберинга? И, наконец, какой вклад в данную вариабельность вносят различные формы барберинга, описанные в литературе? Например, показано, как выбривание вибрисс и шерсти на морде мышей резцами особи-барбера, так и выкусывание и даже выдергивание вибрисс лапами [4]. Несмотря на очевидный схожий итоговый результат (девибриссация особи-реципиента), данные формы поведения фенотипически и, вероятней всего, нейробиологически различаются, и могут по-разному проявляться в поведенческих контекстах и в ходе проведения экспериментов.

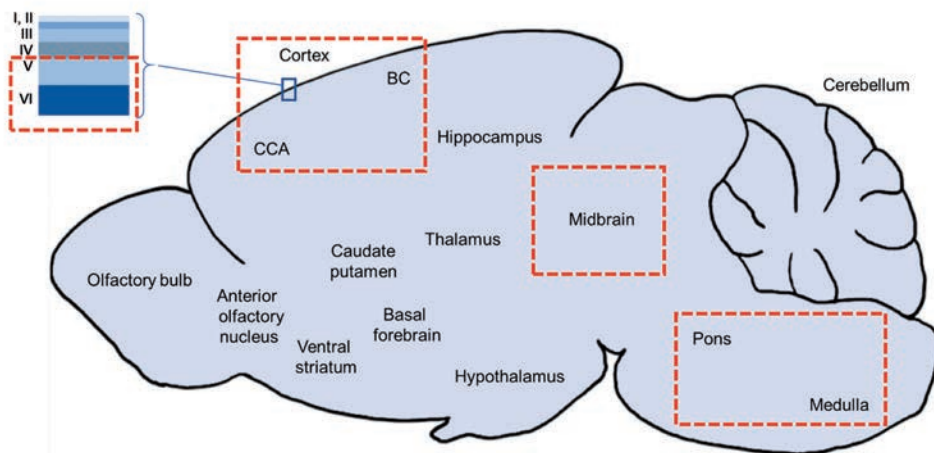


Рис. 4. Схема строения мозга мыши с помеченными пунктиром отделами, ассоциированными с барберингом (см. также табл. 3). Взаимосвязь барберинга со структурами головного мозга характерна для таких регионов, как бочкообразная кора (BC – barrel cortex) [4], V и VI слои коры [28], передняя поясная кора (CCA – cortex cingularis anterior) [31], средний и задний мозг [54, 17].

Один из важных нейробиологических вопросов касается того, какие структуры мозга участвуют в реализации барберинга, и какие ответы ЦНС регистрируются у барбера и у особи-реципиента. Табл. 3 и рис. 4 иллюстрируют имеющиеся крайне немногочисленные данные о вовлечении различных отделов ЦНС в барберинг, что, несомненно, требует дальнейшего исследования. В частности, развитие малоинвазивных методов визуализации активности мозга в перспективе сможет позволить ответить на

данный вопрос непосредственно в момент реализации акта барберинга. Анализ экспрессии генов в мозге у мышей с высоким и низким уровнями барберинга также может дать важную информацию. Например, оценка регионального распределения маркерных ранних протоонкогенов (*c-fos*, *c-jun*, *egr1*) может дать важную информацию о мозговых структурах, активируемых либо в сам в момент барберинга, либо базово вовлеченных в реализацию данного поведения у особей или линий с патологически повышенным или, наоборот, пониженным уровнем барберинга в сравнении с нормальным контролем. Глобальный транскриптомный и метаболомный анализ ЦНС таких групп животных также будет информативен, выявляя возможные молекулярные пути, вовлеченные в реализацию поведения барберинга в различных отделах мозга. Данная работа была бы крайне перспективна, так как в настоящий момент судить о вовлеченности различных путей и структур мозга можно только косвенно (табл. 3, рис. 4). Появление методов регистрации биологических ответов ЦНС на уровне отдельных клеток [50, 51] также может прояснить участие различных групп нейронов и других клеток мозга (например, астроцитов и микроглии) в реализации барберинга.

Таблица 3. Взаимосвязь барберинга грызунов со структурами головного мозга (см. также рис. 4)

Структура	Связь с барберингом	Ссылки
Кора больших полушарий	Плотность дендритов в бочкообразной коре у барберов линии C57BL6 выше, чем у реципиентов	[4]
	У мышей 5xFAD* снижены барберинг, плотность интернейронов в бочкообразной коре и число клеток V–VI слоев коры	[28]
	У мышей с нокаутом <i>Btd3</i> ** увеличены барберинг и плотность дендритных шипиков в поясной извилине	[31]
Средний мозг	У мышей Grb10KO+/р повышены уровень барберинга и экспрессия белка 10, связанного с рецептором фактора роста	[17, 54]
Задний мозг	У мышей Grb10KO+/р повышен уровень барберинга и экспрессия данного белка	[17, 54]
	Регион-зависимый нокаут глюкокортикоидных рецепторов приводит к росту барберинга	[21]

* 5xFAD – генетическая модель болезни Альцгеймера
**Ген, кодирующий белок 3, содержащий домен ВТВ/POZ (BTBD3) – фактор транскрипции, критичный для развития первичной сенсорной коры

Особый интерес вызывает изучение взаимосвязи острого стресса и барберинга. Например, известно, что при сильном стрессе у грызунов, помимо триады «беги–борись–замри», нередко активируется смещенная активность в виде груминга [52, 53]. Может ли барберинг, в том числе ауто- и гетеро-барберинг также активироваться при сильном

стрессе (например, играя роль смещенной активности)? Еще один важный логичный вопрос – насколько общими являются возможные нейрональные пути активации груминга и барберинга? С одной стороны, если барберинг является подтипом груминга, то пути их регуляции могут перекрываться. Однако груминг вовлечен в достаточно широкий спектр поведенческих паттернов, в том числе в реализацию тревожного и депрессивного фенотипа. В случае с барберингом сходство нейрональных путей активации может также наблюдаться с путями гетеро-груминга, который, как и барберинг, вовлечен в реализацию социального поведения. Накопленные сведения, рассмотренные выше, указывают на возможную важную роль серотонин-, холин-, NO- и глутаматергических механизмов ЦНС в регуляции барбенга. Однако еще предстоит выяснить, какие другие медиаторные системы (и как) могут участвовать в его регуляции.

Еще один фундаментально важный вопрос касается соотношения генетических и средовых факторов в проявлении барберинга. Например, в последнее время появляются работы по совместному содержанию групп особей из нескольких линий мышей в одной клетке [55], косвенно свидетельствующие о возможном снижении барберинга в колониях. Насколько содержание мышей с высоким уровнем барберинга вместе с мышами с низким уровнем барберинга может изменять данное поведение в каждой из линий? Интересные эксперименты в данной области можно также провести с использованием приемных родителей (cross-fostering) – например, воспитывая мышат линий с высоким уровнем барберинга с приемными матерями линий с низким уровнем данного поведения («эффект Маугли»), и наоборот.

Актуальный вопрос, рекуррентно возникающий в научной литературе, касается роли агрессии в реализации барберинга. Так, анализ линейных различий в двух данных поведенческих доменах (рис. 3) указывает на четкую негативную корреляцию между агрессией и барберингом у мышей. Иными словами, барберинг, вероятно, выполняет социально буферную роль, позволяя колониям неагрессивных линий решать проблему построения социальной иерархии, не прибегая к дракам и укусам, как это делают высокоагрессивные линии [2, 4]. В то же время среди мышей с выраженным барберингом, как уже указывалось, зачастую существует обратная корреляция, поскольку ему оказываются подвержены менее агрессивные субординантные особи [1, 2]. Несмотря на видимое противоречие, имеется важное различие между сравнением генетически различных линий мышей в первом случае и индивидуальных различий генетически однородных мышей одной линии во втором. Вероятно, барберинг у мышей линии с высоким уровнем данного поведения активно используется для установления социальной иерархии в группе, однако не используется как социальный инструмент в группах мышей линий с низким уровнем барберинга. С другой стороны, возможное добровольное участие обриваемой мыши в процессе барберинга поднимает вопрос о биологической адаптивности барберинга для его реципиента, а также о возможном нейромедиаторном обеспечении данного поведения.

Заслуживают внимания также изучение половых различий в барберинге: подавляющее большинство работ указывает на более активный барберинг у самок, чем у самцов. Самки также чаще демонстрируют барберинг самцов (чем наоборот) при совместном содержании обеих полов [2, 4], а также отличаются большим числом барберов (обычно несколько) на клетку, чем у самцов (обычно 1 на клетку) [11]. С учетом признаваемой важности половых различий в биомедицинских исследованиях на животных и в клинике, изучение нейробиологической природы половых различий в барберинге представляется важной практической и трансляционной задачей. Возможное участие феромонов, в том числе половых, в регуляции барберинга также требует дальнейших исследований. Наконец, целесообразным представляется проведение детального анализа не только самого поведения барберинга (табл. 4), но и других поведенческих и биомаркерных профилей животных с различным статусом барберинга (реципиентов и барберов, а также реципиентов до и после барберинга).

Таблица 4. Отдельные параметры для анализа и регистрации барберинга лабораторных грызунов

Показатели барберинга
Частота встречаемости в колонии: • Общее число или % подверженных барберингу животных • Число или % клеток в виварии, в которых наблюдается барберинг
Характер барберинга: • Ауто- или гетеро-барберинг (первый встречается только у одиночных животных) • Материнский барберинг (самка детенышей или наоборот) • Неонатальный ауто или гетеро-барберинг детенышей • Сексуальный барберинг (самки самцов или наоборот) • Межвидовой (при совместном содержании двух видов в клетке) • Межлинейный (при совместном содержании двух линий грызунов в клетке)
Разновидность барберинга (см. примеры на рис. 1): • Характер потери шерсти (девибриссация путем выдергивания вибрисс, девибриссация за счет сбривания вибрисс, выбривание шерсти, вычесывание шерсти и др.) • Общая локализация (морда, голова, тело и др.) • Специфические особенности (обривание морды, периорбитальных областей, головы и др.) • Встречаемость и частота (%) одновременно нескольких типов барберинга в клетке
Степень выраженности барберинга (можно также использовать совместно со шкалой, например: 0 – не выражено, 1 – выражено, 2 – сильно выражено): • Полное или частичное удаление шерсти на участке алопеции • Число зон алопеции на теле животного • Размеры подверженных участков тела (размеры, общая подверженная площадь, % алопеции от общей площади тела, может оцениваться с использованием методов цифровой визуализации образов)
Временные характеристики барберинга: • Возраст животных на момент появления в их онтогенезе барберинга в клетке • Возраст животных на момент исчезновения в их онтогенезе барберинга в клетке • Продолжительность и частота поведения барберинга в клетке (доступно при использовании систем круглосуточной видеорегистрации с элементами распознавания поведения)
Дополнительные характеристики: • Общая демография (число, %) барберов и реципиентов в клетке • Плотность содержания животных в клетке • Пол, размер и возраст барберов и реципиентов • Общее состояние шерсти животного (тусклая или неопрятная шерсть может быть признаком болезни, стресса или низкого социального статуса) • Наличие следов от укусов и других ран на теле барберов и реципиентов • Иные поведенческие и физиологические характеристики барберов и реципиентов • Источник (виварий происхождения) линии лабораторных грызунов

Таблица может быть модифицирована и упрощена (например, в виде опросника) для практического применения в условиях лабораторий (эксперимента) и вивария.

Безусловно, существует множество других открытых вопросов, связанных с нейробиологией барберинга у лабораторных грызунов (табл. 5). Их решение может послужить не только важной научной задачей в области физиологии и патофизиологии ЦНС, но и иметь практическое значение в ветеринарной и лабораторной практике. Поведенческая гетерогенность барберинга (рис. 1, табл. 1) находит также свое отражение в проблемах с терминологией, используемой для его описания. Как уже отмечалось, в англоязычной литературе существует более 10 синонимов разной степени удачности, которыми описан барберинг. Такое терминологическое разнообразие, на наш взгляд, на сегодняшний день является избыточным и осложняет не только поиск литературы и фенотипов по базам данных, но и сравнение получаемых результатов с данными, описанными другими лабораториями. Поэтому целесообразной и своевременной на данном этапе представляется унификация терминологии для описания данного поведения в отечественной и зарубежной литературе, используя термины «барберинг» и «barbering», при необходимости – с разделением на ауто- и гетерокатегории.

В целом, барберинг является важным аспектом в жизни лабораторных грызунов, присутствующим в той или иной форме практически по всех вивариях [2, 4, 56]. Варьируя по частоте от менее 10% [4] до 100% [57] животных, он затрагивает как аутбредные, так и многие инбредные линии, и может отличаться даже среди сублиний от разных поставщиков [56], что способно существенно влиять на интерпретацию данных, полученных разными лабораториями. Поэтому с учетом его широкой распространенности и многочисленных последствий для ЦНС, поведение барберинга совершенно необходимо активно изучать на различных моделях и уровнях (тщательно и детально регистрируя как в условиях домашних клеток, так и в эксперименте [56]), а также контролировать и учитывать при работе с лабораторными животными и планировании и проведении с ними нейробиологических экспериментов. Необходимым представляется систематически фиксировать фенотип барберинга лабораторных грызунов (табл. 4) в зависимости от формы, локализации и выраженности, а также линии, пола и типа экспериментального воздействия, и указывать данную информацию в научных публикациях. В исследованиях целесообразно также может быть разделение выборок при статистическом анализе в зависимости от наличия и выраженности (или отсутствия) барберинга для выявления степени его влияния на состояние животных и соответственно на возможное течение эксперимента. Такие подходы позволят основательно накопить базу данных для релевантной и более системной оценки вклада барберинга в качестве поведенческого фенотипа в нейробиологических экспериментах.

Таблица 5. Отдельные открытые вопросы в области изучения нейробиологии барберинга

Вопросы
Как происходит проявление барберинга в онтогенезе животного?
Встречается ли барберинг у грызунов в природе?
Какой процент времени лабораторные грызуны тратят на барберинг?
Какова социальная динамика барберинга в группе? Осуществляется ли он преимущественно одной особью-барбером в клетке или другие особи группы также могут участвовать?
Может ли барберинг иметь характер подкрепляющего стимула и в каких условиях?
Будет ли возникать барберинг у диких грызунов, помеченных в лабораторные условия?
Каков нейробиологический субстрат (вовлеченные структуры мозга) барберинга у грызунов?

Продолжение таблицы 5.

Вопросы
Какова возможная поведенческая микроструктура барберинга? Имеется ли стереотипичность в его организации и реализации (по аналогии с микроструктурой груминга)?
Может ли барберинг быть смещенной активностью (например, при сильном стрессе)?
Каково нейромедиаторное обеспечение барберинга? Могут ли эксперименты в реальном времени (микродиализ, вольтамметрия) позволить решить данный вопрос?
Как отличается характер барберинга у лабораторных мышей и крыс? Какие могут быть нейрональные механизмы данных различий, если они есть?
Насколько перекрываются нейромедиаторные механизмы и вовлеченные мозговые структуры груминга и барберинга?
Насколько перекрываются нейромедиаторные механизмы и вовлеченные мозговые структуры агрессии и барберинга?
Как грызуны вокализируют до, во время, и после барберинга? Можно ли использовать анализ вокализации грызунов для анализа нейробиологии барберинга?
Каковы эффекты основных классов нейротропных препаратов на барберинг?
Меняется ли барберинг при действии галлюциногенных препаратов?
Существует ли эпигенетическая регуляция барберинга? Какие эпигенетические механизмы могут вовлекаться в данный процесс?
Связаны ли между собой патологический барберинг и апоптоз, нейровоспаление и нейродегенерация?
Может ли барберинг служить «ранним» (в т.ч. пре-симптоматическим) биомаркером патологии ЦНС?
Какова роль коры мозга в возможной модуляции барберинга?
Отличаются ли мозговые ответы при барберинге у его реализатора и реципиента?
Каковы нейрональные механизмы т.н. «добровольного» барберинга, когда реципиент сам подходит к барберу, в том числе находящемуся за решеткой [57]?
Каковы половые различия в барберинге лабораторных грызунов? Какие у них могут быть нейрональные механизмы?
Существует ли вклад нейроглии (астроцитов и микроглии) в регуляцию барберинга у грызунов?
Коррелирует ли барберинг, нейрогенез и нейрорегенеративные процессы?
Учитывая поведенческую гетерогенность барберинга (табл. 1, рис. 1), каково нейромедиаторное и нейроструктурное обеспечение различных его подтипов?
Каковы нейроморфологические корреляты патологического барберинга или его патологического снижения?
Как ранний (неонатальный) стресс влияет на барберинг?
Существует ли «социальный перенос» барберинга?
Существуют ли физиологические механизмы индивидуальной резистентности (малой склонности) к барберингу?

Продолжение таблицы 5.

Вопросы
Может ли барберинг передаваться трансгенерационно?
Можно ли индуцировать барберинг путем экспериментальной активации (например, оптогенетически) специфических отделов мозга?
Насколько перекрываются нейрохимические и нейрофизиологические механизмы у ауто- и гетеро-барберинга?
Каковы нейробиологические механизмы модулирующего воздействия обогащения среды (environmental enrichment) на барберинг?
Существует ли для барберинга взаимодействие генов со средой (Gene-Environment interactions)?
Какие новые генетические детерминанты барберинга у грызунов?
Есть ли взаимосвязь между барберингом и микробиотой кишечника (в контексте оси мозг – кишечник)? Можно ли корректировать барберинг микро- и пробиотически?
Как можно применить методы искусственного интеллекта для анализа барберинга у лабораторных грызунов?
Насколько коррелируют между собой ауто- и гетеро-барберинг? Имеются ли у них общие механизмы в ЦНС? Может ли усиление одной формы барберинга спровоцировать усиление другой?
Индивидуальное содержание грызунов является фактором социального стресса (социальная изоляция) и тревожности, а также фактором обеднения среды обитания. Какой из этих факторов является непосредственным триггером ауто-барберинга?
Насколько часты случаи, когда в одной и той же клетке происходит гетеро- и ауто-барберинг? Как можно экспериментально (например, с использованием длительной регистрации поведения и нейросетей) разделить вклад каждого подтипа в общий итоговый фенотип барберинга?
Насколько коррелируют между собой ауто-барберинг и ауто-груминг, а также гетеро-барберинг и гетеро-груминг? Есть ли корреляция между ауто-грумингом и гетеро-барберингом, а также гетеро-грумингом и ауто-барберингом?
Какова взаимосвязь между грумингом и барберингом, например, при стрессе? Являются ли данные формы поведения конкурентными, или одна может синергично привести к усилению другой?
Как соотносятся генетические и средовые факторы при проявлении барберинга? Например, имеются работы по совместному содержанию особей из нескольких линий мышей в одной клетке [55]. Насколько содержание мышей линий с генетически обусловленным высоким уровнем барберинга вместе с мышами с низким уровнем может изменять данное поведение в каждой из линий?
Описано наличие вариаций барберинга среди сублиний мышей, в том числе от разных поставщиков [56]. Каков реальный масштаб данной проблемы и ее вклад в поведение грызунов?

Окончание таблицы 5.

Вопросы
Как повлияет на проявление барберинга у мышат линий с высоким уровнем данного поведения, выросших у приемных матерей линий с низким барберингом (эффект Маугли)? И наоборот?
Известно, что несмотря на существенное биологическое сходство, поведенческие стратегии и локомоторные паттерны мышей и крыс отличаются. Каковы различия между двумя видами лабораторных грызунов в поведении (этограммах) ауто- и гетеро-барберинга?
Насколько перекрываются генетические детерминанты барберинга грызунов и гены-кандидаты обсессивно-компульсивного расстройства болезней нарушения груминга и трихотилломании человека?
Рассмотренные в работе данные указывают на возможную роль серотонин-, холин-, NO- и глутаматергических механизмов ЦНС в регуляции барберинга. Какие другие медиаторные системы и как могут участвовать в его регуляции?
Влияет ли на паттерны ауто- и гетеро-барберинга шерсти экспериментальная девибриссация?
Как влияет на барберинг грызунов изменение ольфакторной функции (например, деольфактация, экспериментально вызванная anosmia)?
Участвуют ли феромоны (и какие) в регуляции барберинга?
Каковы нейробиологические триггеры барберинга? Имеется ли у подвергаемых барберингу животных подобие виктимного поведения?
Изменяется ли барберинг в экспериментальных моделях аутизма, асоциального поведения и синдрома гиперактивности?
Каковы поведенческие и биомаркерные профили животных с различным статусом барберинга (реципиентов и барберов, а также реципиентов до и после барберинга)?
Каково трансляционное значение барберинга грызунов в контексте социального и грумингового поведения человека?

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (А. В. К.), проведение исследования (М. М. К., В. Д. Р., А. В. К.), анализ и обсуждение результатов (М. М. К., А. В. К.), написание и редактирование манускрипта (М. М. К., В. Д. Р., А. В. К.), обсуждение и одобрение финальной версии (М. М. К., В. Д. Р., А. В. К.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Санкт-Петербургского государственного университета и бюджета Научно-технологического университета «Сириус».

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. Тур МА, Белозерцева ИВ (2017) Влияние спонтанной частичной сенсорной депривации на поведение самцов мышей линии C57BL/6N. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 103: 161–171. [Tur M, Belozertseva I (2017) Influence of spontaneous partial sensory deprivation on male C57BL/6N mice behavior. Russ J Physiol 103: 161–171. (In Russ)].
2. Kalueff AV, Minasyan A, Keisala T, Shah ZH, Tuohimaa P (2006) Hair barbering in mice: Implications for neurobehavioural research. Behav Proc 71(1): 8–15.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2005.09.004>
3. Калыев АВ, Туохимаа П (2005) Эффект Далилы в нейробиологических исследованиях. Нейронауки 1(1): 24–28. [Kalueff AV, Tuohimaa P (2005) The Dalila effects in neurobehavioural experiments. Russ J Neurosci 1(1): 24–28. (In Russ)].
4. Sarna JR, Dyck RH, Whishaw IQ (2000) The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. Behav Brain Res 108(1): 39–45.
[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00137-0)
5. Hanna P (1991) Prince Edward Island. Symmetrical truncal alopecia in rats. Can Vet J 32(3): 180.
6. Mulder A, Nieuwenkamp AE, van der Palen JG, van Rooijen GH, Beynen AC (1992) Supplementary hay reduces fur chewing in rabbits. Tijdschrift voor diergeneeskunde 117(22): 655–658.
7. Bays T (2006) Rabbit Behavior. Exotic Pet Behavior. 1–49.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-0009-9.50008-6>
8. Liss C, Litwak K, Tilford D, Reinhardt V (2015) Comfortable Quarters for Laboratory Animals. 10th Edition.
9. González C, Yáñez JM, Tadich T (2018) Determination of the Genetic Component of Fur-Chewing in Chinchillas (*Chinchilla lanigera*) and Its Economic Impact. Animals 8: 9.
<https://doi.org/10.3390/ani8090144>
10. Garner JP, Weisker SM, Dufour B, Mench JA (2004) Barbering (fur and whisker trimming) by laboratory mice as a model of human trichotillomania and obsessive-compulsive spectrum disorders. Compar Med 54(2): 216–224.
11. Strozik E, Festing MF (1981) Whisker trimming in mice. Lab Anim 15(4): 312.
<https://doi.org/10.1258/002367781780953040>
12. Bresnahan JF, Kitchell BB, Wildman MF (1983) Facial hair barbering in rats. Lab Anim Sci 33(3): 290–291.
13. Hart PC, Bergner CL, Dufour B, Smolinsky A, Egan R, LaPorte JL, Kalueff AV (2011) Analysis of Abnormal Repetitive Behaviors in Experimental Animal Models. In: Translational Neuroscience in Animal Research: Advancement, Challenges, and Research Ethics: 71–82.
14. Багметова ВВ (2013) Психотропные свойства и аспекты механизмов действия новых производных гамма-аминомасляной и глутаминовой кислот. Автореф диссер докт мед наук. Волгоград. [Bagmetova VV (2013) Psychotropic properties and aspects of mechanisms of action of new derivatives of gamma-aminobutyric and glutamic acids. Thesis Doct Med Sci Disser Volgograd. (In Russ)].
15. Harkness JE (2001) What is your diagnosis? Hair loss in lactating rats. Barbering by damor sucklings. Lab Animal 30(4): 21–22.
16. Brodtkin ES (2007) BALB/c mice: low sociability and other phenotypes that may be relevant to autism. Behav Brain Res 176(1): 53–65.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.06.025>
17. Rienecker KDA, Chavasse AT, Moorwood K, Ward A, Isles AR (2020) Detailed analysis of paternal knockout Grb10 mice suggests effects on stability of social behavior, rather than social dominance. Genes Brain Behav 19(1): e12571.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12571>
18. Müller K, Lengheimer T, Kral-Pointner JB, Wojta J, Yeghiazaryan L, Krall C, Palme R, Kleindorfer S, Plasenzotti R, Pollak DD, Tillmann KE (2022) Exposure to soiled bedding reduces abnormal repetitive behaviors in mice. Front Behav Neurosci 2022: 16.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1062864>
19. Garner JP, Dufour B, Gregg LE, Weisker SM, Mench JA (2004) Social and husbandry factors affecting the prevalence and severity of barbering (‘whisker trimming’) by laboratory mice. Appl Anim Behav Sci 89(3): 263–282.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.07.004>
20. Nicholson A, Malcolm RD, Russ PL, Cough K, Touma C, Palme R, Wiles MV (2009) The response of C57BL/6J and BALB/cJ mice to increased housing density. J Am Assoc Lab Anim Sci 48(6): 740–753.
21. Gannon AL, O'Hara L, Mason JI, Rebourcet D, Smith S, Traveres A, Alcaide-Corral CJ, Frederiksen H, Jørgensen A, Milne L, Mitchell RT, Smith LB (2019) Ablation of glucocorticoid receptor in the hindbrain of the mouse provides a novel model to investigate stress disorders. Sci Rep 9(1): 3250.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39867-y>

22. *Dufour BD, Adeola O, Cheng HW, Donkin SS, Klein JD, Pajor EA, Garner JP* (2010) Nutritional up-regulation of serotonin paradoxically induces compulsive behavior. *Nutr Neurosci* 13(6): 256–264. <https://doi.org/10.1179/147683010x12611460764688>
23. *Moody CM, Paterson EA, Leroux-Petersen D, Turner PV* (2021) Using Paper Nest Pucks to Prevent Barbering in C57BL/6 Mice. *J Amer Assoc Lab Anim Sci* 60(2): 133–138. <https://doi.org/10.30802/aalas-jaalas-20-000047>
24. *Wang F, Zhu J, Zhu H, Zhang Q, Lin Z, Hu H* (2011) Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex. *Science* 334(6056): 693–697. <https://doi.org/10.1126/science.1209951>
25. *Wang F, Kessels HW, Hu H* (2014) The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy. *Trends Neurosci* 37(11): 674–682. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.07.005>
26. *Kalueff AV, Keisala T, Minasyan A, Kuuslahti M, Miettinen S, Tuohimaa P* (2006) Behavioural anomalies in mice evoked by "Tokyo" disruption of the Vitamin D receptor gene. *Neurosci Res* 54(4): 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.12.008>
27. *Torres-Lista V, Giménez-Llort L* (2019) Vibrating Tail, Digging, Body/Face Interaction, and Lack of Barbering: Sex-Dependent Behavioral Signatures of Social Dysfunction in 3xTg-AD Mice as Compared to Mice with Normal Aging. *J Alz Dis* 69(4): 969–977. <https://doi.org/10.3233/jad-190253>
28. *Flanigan TJ, Xue Y, Kishan Rao S, Dhanushkodi A, McDonald MP* (2014) Abnormal vibrissa-related behavior and loss of barrel field inhibitory neurons in 5xFAD transgenics. *Genes Brain Behav* 13(5): 488–500. <https://doi.org/10.1111/gbb.12133>
29. *Lijam N, Paylor R, McDonald MP, Crawley JN, Deng CX, Herrup K, Stevens KE, Maccaferri G, McBain CJ, Sussman DJ, Wynshaw-Boris A* (1997) Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking Dvl1. *Cell* 90(5): 895–905. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80354-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80354-2)
30. *Sugimoto H, Ikeda K, Kawakami K* (2018) Atp1a3-deficient heterozygous mice show lower rank in the hierarchy and altered social behavior. *Genes Brain Behav* 17(5): e12435. <https://doi.org/10.1111/gbb.12435>
31. *Thompson SL, Welch AC, Ho EV, Bessa JM, Portugal-Nunes C, Morais M, Young JW, Knowles JA, Dulawa SC* (2019) Btbd3 expression regulates compulsive-like and exploratory behaviors in mice. *Transl Psychiatry* 9(1): 222. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0558-7>
32. *Hill RA, McInnes KJ, Gong EC, Jones ME, Simpson ER, Boon WC* (2007) Estrogen deficient male mice develop compulsive behavior. *Biol Psychiatry* 61(3): 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.01.012>
33. *Mi Y, Fiete D, Baenziger JU* (2008) Ablation of GalNAc-4-sulfotransferase-1 enhances reproduction by altering the carbohydrate structures of luteinizing hormone in mice. *J Clin Invest* 118(5): 1815–1824. <https://doi.org/10.1172/jci32467>
34. *Duysen EG, Stribley JA, Fry DL, Hinrichs SH, Lockridge O* (2002) Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse. *Dev Brain Res* 137(1): 43–54. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(02\)00367-X](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(02)00367-X)
35. *Casarotto PC, Biojone C, Montezuma K, Cunha FQ, Joca SRL, Castren E, Guimaraes FS* (2018) Inducible nitric oxide synthase (NOS2) knockout mice as a model of trichotillomania. *Peer J* 6: e4635. <https://doi.org/10.7717/peerj.4635>
36. *Diniz CRAF, Becari C, Lesnikova A, Biojone C, Salgado MCO, Salgado HC, Resstel LBM, Guimarães FS, Castrén E, Casarotto PC, Joca SRL* (2018) Elastase-2 Knockout Mice Display Anxiogenic- and Antidepressant-Like Phenotype: Putative Role for BDNF Metabolism in Prefrontal Cortex. *Mol Neurobiol* 55(8): 7062–7071. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0902-6>
37. *Feusner JD, Hembacher E, Phillips KA* (2014) The Mouse Who Couldn't Stop Washing: Pathologic Grooming in Animals and Humans. *CNS Spectrums* 14(9): 503–513. <https://doi.org/10.1017/S1092852900023567>
38. *Garner JP, Thogerson CM, Dufour BD, Würbel H, Murray JD, Mench JA* (2011) Reverse-translational biomarker validation of Abnormal Repetitive Behaviors in mice: An illustration of the 4P's modeling approach. *Behav Brain Res* 219(2): 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.002>

39. Koh HY, Kim D, Lee J, Lee S, Shin HS (2008) Deficits in social behavior and sensorimotor gating in mice lacking phospholipase Cbeta1. *Genes Brain Behav* 7(1): 120–128.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00351.x>
40. Kafkafi N, Agassi J, Chesler EJ, Crabbe JC, Crusio WE, Eilam D, Gerlai R, Golani I, Gomez-Marin A, Heller N, Iraqi F, Jaljuli I, Karp NA, Morgan H, Nicholson G, Pfaff DW, Richter SH, Stark PB, Stiedl O, Stodden V, Tarantino LM, Tucci V, Valdar W, Williams RW, Würbel H, Benjamini Y (2018) Reproducibility and replicability of rodent phenotyping in preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 87: 218–232.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.01.003>
41. Usui T, Macleod MR, McCann SK, Senior AM, Nakagawa S (2021) Meta-analysis of variation suggests that embracing variability improves both replicability and generalizability in preclinical research. *PLoS Biol* 19(5): e3001009.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001009>
42. Smolinsky AN, Bergner CL, LaPorte JL, Kalueff AV (2009) Analysis of Grooming Behavior and Its Utility in Studying Animal Stress, Anxiety, and Depression. In: Gould TD (ed). *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests*. Totowa, NJ. Humana Press. 21–36.
43. Spruijt BM, van Hooff JA, Gispen WH (1992) Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev* 72(3): 825–852.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.3.825>
44. Berridge KC, Aldridge JW, Houchard KR, Zhuang X (2005) Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biol* 3(1): 4.
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-4>
45. Kyzar E, Gaikwad S, Roth A, Green J, Pham M, Stewart A, Liang Y, Kobla V, Kalueff AV (2011) Towards high-throughput phenotyping of complex patterned behaviors in rodents: focus on mouse self-grooming and its sequencing. *Behav Brain Res* 225(2): 426–431.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.052>
46. Richardson CA (2015) The power of automated behavioural homecage technologies in characterizing disease progression in laboratory mice: A review. *Appl Anim Behav Sci* 163: 19–27.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.11.018>
47. Kordás K, Kis-Varga Á, Varga A, Elderling H, Bulthuis R, Lendvai B, Lévy G, Román V (2020) Measuring sociability of mice using a novel three-chamber apparatus and algorithm of the LABORAST™ system. *J Neurosci Methods* 343: 108841.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108841>
48. Slambergová R, Macúchová E, Nohejlová-Deykun K, Schutová B, Hrubá L, Rokyta R (2013) Gender differences in the effect of prenatal methamphetamine exposure and challenge dose of other drugs on behavior of adult rats. *Physiol Res* 62(Suppl 1): S99–S108.
<https://doi.org/10.33549/physiolres.932593>
49. Castagné V, Wolinsky T, Quinn L, Virley D (2012) Differential behavioral profiling of stimulant substances in the rat using the LABORAST™ system. *Pharmacol Biochem Behav* 101(4): 553–563.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.03.001>
50. Stuart T, Satija R (2019) Integrative single-cell analysis. *Nat Rev Gen* 20(5): 257–272.
<https://doi.org/10.1038/s41576-019-0093-7>
51. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Prinz M (2020) Microglia heterogeneity in the single-cell era. *Cell Rep* 30(5): 1271–1281.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.010>
52. Kalueff AV, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC (2016) Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 17(1): 45–59.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
53. Song C, Berridge KC, Kalueff AV (2016) 'Stressing' rodent self-grooming for neuroscience research. *Nat Rev Neurosci* 17(9): 591–592.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.103>
54. Garfield AS, Cowley M, Smith FM, Moorwood K, Stewart-Cox JE, Gilroy K, Baker S, Xia J, Dalley JW, Hurst LD, Wilkinson LS, Isles AR, Ward A (2011) Distinct physiological and behavioural functions for parental alleles of imprinted Grb10. *Nature* 469(7331): 534–538.
<https://doi.org/10.1038/nature09651>
55. Walker M, Fureix C, Palme R, Newman JA, Dallaire JA, Mason G (2016) Mixed-strain housing for female C57BL/6, DBA/2, and BALB/c mice: validating a split-plot design that promotes refinement and reduction. *BMC Med Res Methodol* 16: 11.
<https://doi.org/10.1186/s12874-016-0113-7>

56. Kahnau P, Jaap A, Hobbiesiefken U, Mieske P, Diederich K, Thöne-Reineke C, Lewejohann L, Hohlbaum K (2022) A preliminary survey on the occurrence of barbering in laboratory mice in Germany. *Anim Welfare* 31(4): 433–436.
<https://doi.org/10.7120/09627286.31.4.009>
57. Van den Broek FA, Omtzigt CM, Beynen AC (1993) Whisker trimming behaviour in A2G mice is not prevented by offering means of withdrawal from it. *Lab Anim* 27(3): 270–272.
<https://doi.org/10.1258/002367793780745462>

Barbering in Laboratory Rodents: Problems and Prospects

M. M. Kotova^a, V. D. Riga^a, and A. V. Kalueff^{a, b, c, *}

^aNeurobiology Program, Scientific Center for Genetics and Life Sciences, Scientific and Technological University “Sirius”, Federal Territory Sirius, Russia

^bInstitute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg,

Russia^cInstitute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

*e-mail: avkalueff@gmail.com

Barbering is a behaviorally induced alopecia (hair and whisker biting) often observed in laboratory mice and rats. The role of this behavior is actively discussed, in particular, its relationship with stress, aggression, grooming and aberrant stereotypic behavior. Understanding the nature of barbering and its content in the state of laboratory animals is an important factor to consider in experimental work. Here, we discuss recent data on the neurobiology and genetics of barbering, as well as its role in the behavior and central nervous system of rodents.

Keywords: barbering, mice, grooming, rats

ОБЗОРЫ

АНАЛИЗ ГРУМИНГА ГРЫЗУНОВ И ЕГО ПОВЕДЕНЧЕСКОЙ
МИКРОСТРУКТУРЫ В СОВРЕМЕННЫХ НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЯХ

© 2024 г. К. В. Апухтин¹, А. Д. Шевляков¹, М. М. Котова¹, С. В. Амикишиев¹,
В. Д. Рига¹, А. Д. Волгин¹, А. В. Калусев^{1, 2, 3, 4, *}

¹Направление «Нейробиология», Научный центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория Сириус, Россия

²Институт экспериментальной медицины, Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

³Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: avkalueff@gmail.com

Поступила в редакцию 12.04.2024 г.

После доработки 16.05.2024 г.

Принята к публикации 17.05.2024 г.

Груминг является сложным поведением животных и используется как показатель физиологического состояния грызунов при влиянии стресса. В работе проанализировано влияние различных экспериментальных факторов (в т.ч. генетических, фармакологических и физиологических) на ауто-груминг лабораторных мышей и крыс. При анализе груминга оценивают не только количество и частоту актов, но и его микроструктуру – последовательность и локализацию данного поведения. Груминг и его микроструктура могут служить чувствительным маркером предрасположенности к патологическим состояниям, моделирующим психические расстройства человека, таким как обсессивно-компульсивное расстройство, аутизм и депрессия. Изучение микроструктуры ауто-груминга грызунов может дать ценную информацию о механизмах патогенеза мозга и имеет важную трансляционную значимость в нейробиологических исследованиях.

Ключевые слова: груминг, грызуны, микроструктура груминга, заболевания ЦНС

DOI: 10.31857/S0869813924060022, **EDN:** BFDDUM

ВВЕДЕНИЕ

Груминг (grooming) – эволюционно древнее естественное поведение животных различных таксонов, способствующее поддержанию гигиены, терморегуляции, социализации и ряду других функций [1, 2]. Являясь важнейшим и (после сна) наиболее выраженным поведением грызунов, оно разделяется на ауто- и гетерогруминг (рис. 1). У грызунов ауто-груминг имеет определенные повторяющиеся паттерны – так называ-

(a)

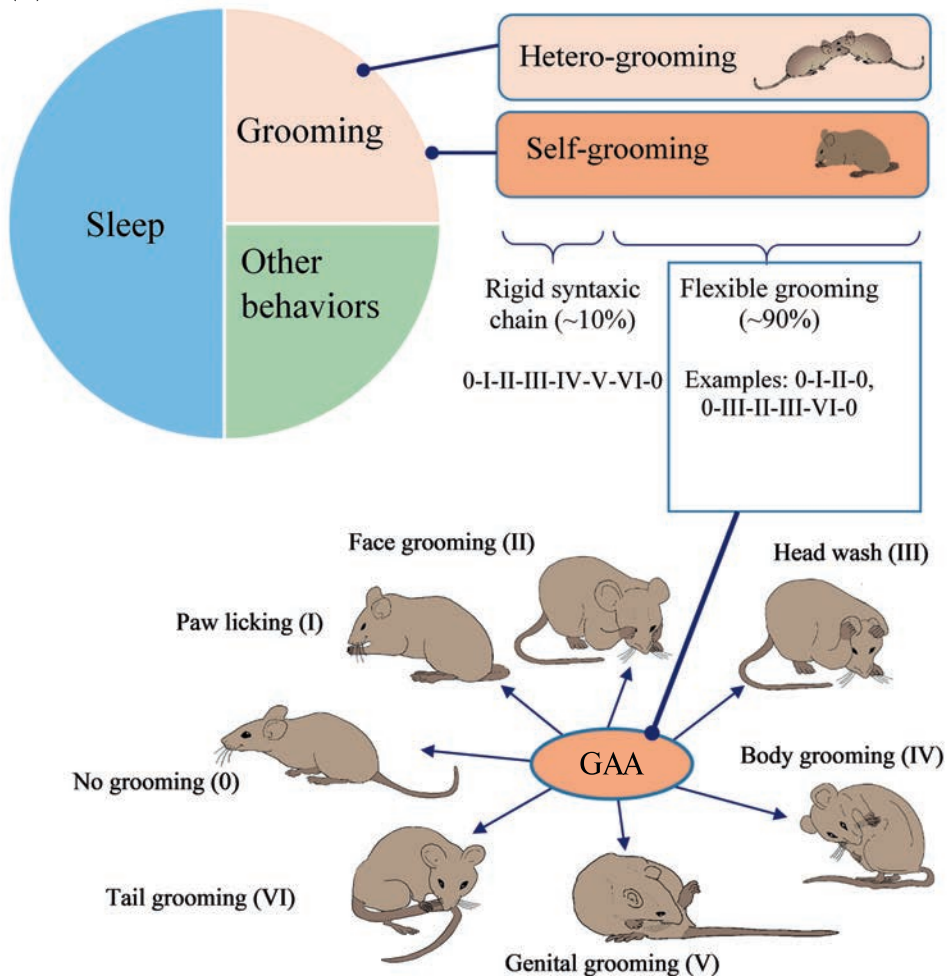


Рис. 1 (а). Груминг лабораторных грызунов (а) и методы оценки его микроструктуры (б) с использованием Алгоритма анализа груминга [6–9] (ААГ/ГАА, см. табл. 1 и текст далее). Каждое отдельное событие ауто-груминга является актом (bout), состоящим из отдельных стадий (эпизодов, episodes/stages) груминга (табл. 2). Первые три стадии направлены на переднюю часть тела и относятся к ростральному грумингу, остальные относят к каудальному грумингу. Переходы от одной стадии к другой называются переходами и оцениваются как правильные (в росто-каудальном направлении 0-I-...-VI-0) или неправильные, с нарушением направленности – например, реверсии, пропуски стадий. Акты груминга могут быть полными (вся последовательность) или неполными – например, абортными (прерванными ранее, чем стадия VI) либо неправильно начавшимися с более поздних стадий. Прерывания менее 2 с считаются как остановки внутри акта груминга, и число таких остановок груминга, а также % актов с остановками учитывается при анализе поведения. Примеры методов визуализации микроструктуры груминга в нейробиологических исследованиях представлены на рис. 2.

(b)

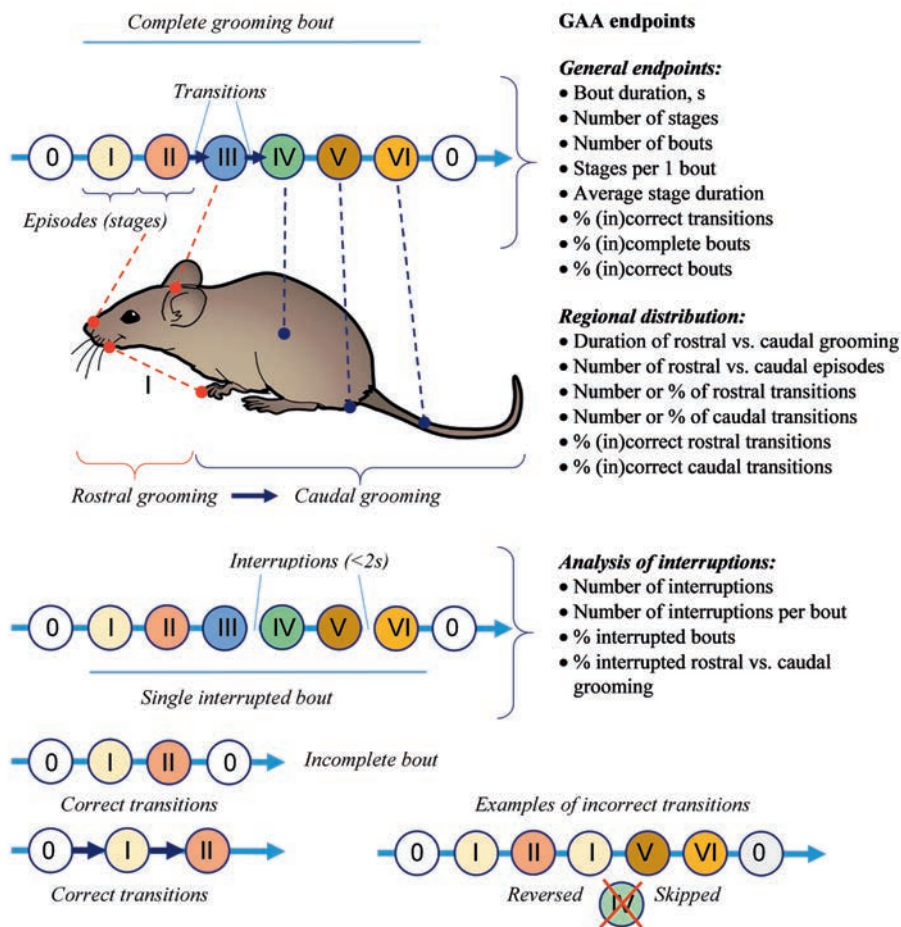
Grooming Analysis Algorithm (GAA)

Рис. 1 (Продолжение).

емую микроструктуру (microstructure, patterning, см. далее), что делает оценку данного поведения лабораторных мышей и крыс хорошей моделью для нарушений поведения, свойственных ряду психических заболеваний [3].

Поведение груминга самым тесным образом связано со стрессом. Например, острый стресс усиливает частоту и длительность груминга, по-видимому, являясь классической смещенной реакцией [4]. Это, а также его стереотипность и повторяемость делают ауто-груминг полезным фенотипом для моделирования стрессорных

расстройств. В то же время при длительном хроническом стрессе грызуны уделяют грумингу меньшее время, не заботясь о шерсти и коже. Соответственно нарушения ауто-груминга также могут быть использованы при моделировании последствий хронического стресса и связанных с ним аффективных или тревожных заболеваний ЦНС человека [1–4].

Груминг лабораторных грызунов часто исследуют как в эксперименте, так и (по состоянию шерсти) в домашней клетке для оценки общего благополучия животных в виварии. В этом случае обычно применяют шкалу оценки общего состояния шерсти (0 – не ухожена, 1 – в хорошем состоянии), либо делят тело на несколько частей (например, голову, шею, спину, живот, лапы, генитальную область и хвост) и каждой присуждают балл (0 или 1), сумма которых дает интегральный индекс груминга [5]. Есть и другие, более сложные способы оценки груминга, например, по количеству затронутых областей, их порядку очистки и частоте или продолжительности груминга [6] (рис. 1). Как будет показано в настоящей статье, такая тонкая микроструктура груминга используется все чаще и чаще в качестве вспомогательного показателя поведенческого фенотипа, оцениваемого в эксперименте на животных.

В частности, для оценки поведенческой микроструктуры ауто-груминга нами ранее был разработан подход, позволяющий количественно оценить последовательность эпизодов различных типов груминга – так называемый Алгоритм анализа груминга (ААГ, Grooming Analysis Algorithm, GAA, рис. 1) для крыс и мышей [7, 8]. В рамках ААГ микроструктура груминга может быть проанализирована путем измерения продолжительности, частоты и переходов различных стадий, а также его регионально-го распределения и количества полных завершенных актов [6], обычно совершаемых грызунами в росто-каудальном (цефало-каудальном) порядке от головы к хвосту [1–4] (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Основные типы ауто-груминга у грызунов (также см. рис. 1)

Зона тела	Поведение
Лапы и нос	Эллиптические двусторонние движения лапой, совершаемые возле носа
Морда	Короткие односторонние движения от вибрисс до области под глазом
Голова	Двухсторонние гребки назад и вверх за ушами и над макушкой обеими лапами
Тело	Облизывание тела и переход к спине, генитальной области и хвосту

Данные последних лет показывают, что груминг является важным поведением в нейробиологических исследованиях, а оценка микроструктуры ауто-груминга – ценным инструментом при моделировании заболеваний ЦНС на грызунах (см. далее), который может выявить тонкие различия в поведении животных, далеко не всегда легко обнаруживаемые измерением количества актов или длительности груминга [1]. Цель настоящей работы – подчеркнуть особую важность анализа ауто-груминга грызунов в эксперименте и провести анализ накопленной практики оценки уровня микроструктуры груминга грызунов и опыта применения ААГ (табл. 2) различными лабораториями мира в нейробиологических исследованиях на грызунах.

Тестирование животных для изучения груминга проводится в небольшом прозрачном цилиндре и длится обычно 5–10 мин, в ходе которого поведение грызунов записывается одной (или несколькими) камерами с фронтальной, угловой или вертикальной позиций, для дальнейшего анализа либо вручную (хорошо обученными исследователями), либо с использованием программного обеспечения (которые в настоящее вре-

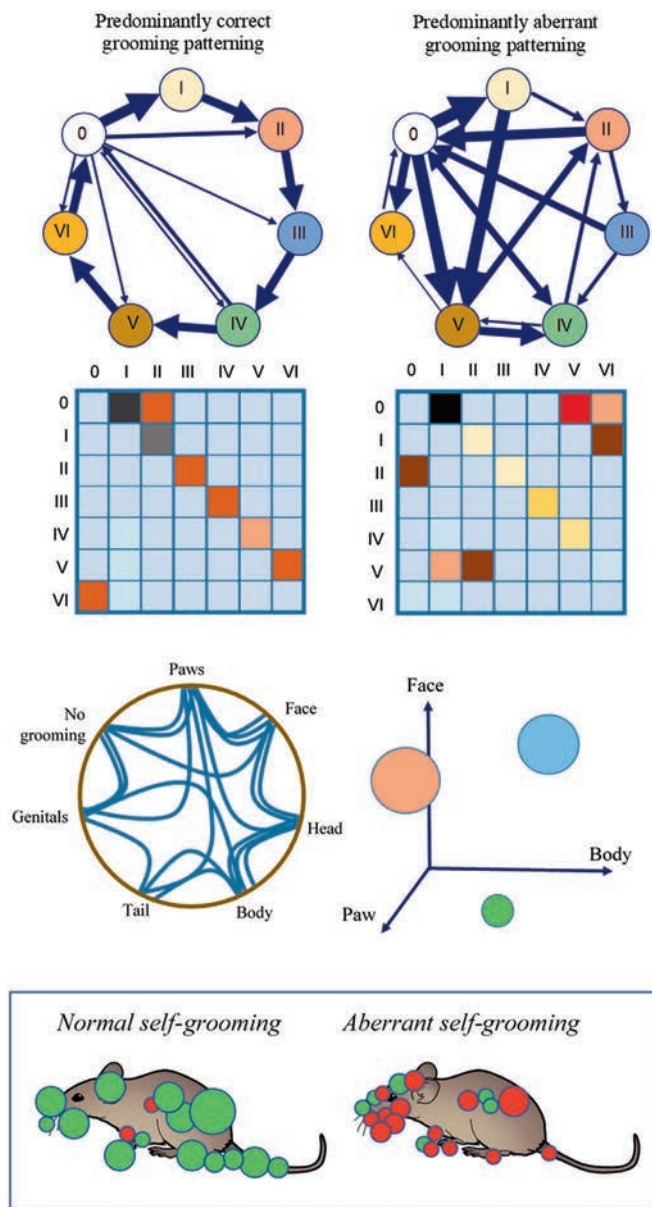


Рис. 2. Примеры визуализации микроструктуры груминга в нейробиологических исследованиях, включая этограммы (верхние панели), матрицы (средние панели), а также циркулярные флоу-граммы и трехмерный плоттинг (нижние диаграммы соответственно). На этограммах и в виде матрикса переходов представлены примеры обычного, ненарушенного груминга (слева) и аномального груминга с нарушенной микроструктурой (справа). В рамке дополнительно показаны примеры визуализации регионального распределения груминга, с разделением точек различного цвета на правильные (зеленые) и неправильные (красные) стадии, продемонстрированные за время тестирования в рамках или в нарушении росто-каудального вектора соответственно. Диаметр точек отражает их продолжительность. Стоит отметить преобладание длительных правильных стадий в случае нормального груминга (слева) и наличие большого числа коротких неправильных и преимущественно ростральных стадий при патологическом груминге (справа).

Таблица 2. Классификация паттернов ауто-груминга грызунов согласно Алгоритму анализа груминга (ААГ, GAA) [6–9] (см. рис. 1)

Номер стадии	Действие
0	Отсутствие груминга
1	Вылизывание передних лап
2	Вылизывание морды и носа
3	Мытье головы
4	Вычесывание тела (включая вычесывание тела задними лапами)
5	Вылизывание хвоста
6	Вылизывание гениталий

мя широко доступны на рынке, см. далее). В ААГ с помощью матрицы переходов [9] определяется частота каждого этапа, количество правильных и неправильных переходов между двумя этапами груминга, а также количество прерванных актов (рис. 1). Правильные переходы от одного этапа груминга к другому определяются как переходы между двумя последующими этапами груминга (например, 1–2 или 4–5). Неправильные переходы определяются как переходы между двумя несмежными стадиями груминга или в обратной последовательности (например, 0–6, 1–4 или 6–5). Наконец, прерванные акты определяются как пауза > 2 с во время груминга, если данное поведение не закончилось на стадии 6. В эксперименте рассчитывается общая частота переходов (сумма правильных и неправильных переходов), чтобы оценить общую активность груминга [6–9]. Как правило, стресс и различные дисфункции ЦНС нарушают микроструктуру груминга в ААГ, приводя к росту неправильных переходов, прерванных актов и нарушения регионального распределения груминга [1, 4, 6–9].

НАРУШЕНИЯ ГРУМИНГА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

Как уже отмечалось, микроструктура груминга – это совокупность его паттернов и последовательностей (рис. 1), на которую влияют различные экспериментальные факторы и воздействия, такие как стресс, лекарственные препараты, а также гормональные и генетические манипуляции. Одним из мощных видов стресса является депривация сна, недостаток которого у грызунов влияет на уровень тревожности, материнское поведение и груминг. С помощью ААГ показано, что крысы-самцы с недостатком сна чаще совершают «неправильные» (вопреки росто-каудальному вектору) переходы между стадиями груминга, что может говорить о росте тревожности [10]. При депривации сна беременных самок, наоборот, у животных уменьшается количество актов груминга и не изменяется материнское поведение [11]. Похожее поведение имеют также самки в послеродовой период [12] – у них хоть и снижается ауто-груминг внутри гнезда с потомством, однако отмечается больше неправильных переходов и прерванных актов. Поведение, связанное с грумингом, проявляется в зависимости от контекста, что указывает на анксиолиз (когда кормящая самка находится в контакте со своим пометом) и тревожность (когда она находится отдельно от детенышей). Поскольку такие данные невозможно получить в приподнятом крестообразном лабиринте или открытом поле (тестах, являющихся золотым стандартом измерения тревожного поведения), анализ микроструктуры груминга с использованием ААГ является удобным дополнительным инструментом для нейробиологических исследований.

Оценка микроструктуры важна при анализе фармакологических соединений и лекарственных препаратов, так как такой метод представляет более полную карти-

ну для определения эффектов психотропных веществ (табл. 3). Например, груминг и его микроструктура являются чувствительными к острому воздействию многих нейротропных препаратов, в т.ч. флуоксетина, амитриптилина [13], прегабалина, стрептозотоцина [14], вальпроевой кислоты [15], фенциклидина, скополамина [16], бупренорфина [17], клоназепама [18], аллопрегнанолона [19] и диэтиламида d-лизергиновой кислоты (ЛСД) [20]. Анализ груминга и его микроструктуры также обнаруживает чувствительность к хроническому воздействию ряда нейротропных препаратов [21–23]. Например, при действии кокаина с метилликаонитином – антагонистом $\alpha 7$ никотинового ацетилхолинового рецептора, происходит частый ауто-груминг у мышей вплоть до потери шерсти, с частыми прерываниями [22]. Кортикостерон увеличивает количество актов и время груминга, а также уменьшает латентность начала груминга, что свидетельствует о тревожно-подобном поведении [23] (но см. [21]). Эти данные очередной раз подчеркивают важность детального анализа как уровня груминга, так и изменений его микроструктуры в нейробиологических и нейрофармакологических исследованиях.

Интересным подходом к изучению влияния физиологически активных соединений на ЦНС является взаимосвязь груминга и других форм поведения грызунов по отношению к хищнику. Так, при влиянии гербицида галоксифоп-П-метилового эфира в прогнозируемых экологически значимых концентрациях возникает нарушение реакции на хищников [24]: животные под влиянием препарата хуже избегали змею и демонстрировали повышенный груминг, а не замирание.

Таблица 3. Влияние физиологически активных соединений на ауто-груминг грызунов

Препарат	Доза	Способ введения	Эффект на груминг (вид)	Ссылки
Общее изменение структуры груминга				
Амитриптилин	5 и 10 мг/кг	Внутривенно (вв)	Уменьшение общей продолжительности груминга у крыс, уменьшение общего количество паттернов и переходов, а также средней продолжительности акта груминга (здесь и далее)	[13, 24]
Флуоксетин	5 и 10 мг/кг	Вв	Уменьшение общей продолжительности груминга у крыс, общего количество паттернов и переходов между ними, а также общего количеств актов	

Продолжение таблицы 3.

Препарат	Доза	Способ введения	Эффект на груминг (вид)	Ссылки
Прегабалин	200 мг/кг	Вв	Нет эффектов на частоту и длительность актов у крыс	[14]
Стрептозотцин	200 мг/кг	Вв	Нет эффектов на частоту актов у крыс, более частые внезапные всплески быстрого и интенсивного груминга	
Прегабалин и Стрептозотцин	200 мг/кг	Вв	Снижение количества актов груминга у крыс	
Фенциклидин	3 мг/кг	Внутрибрюшинно (вб)	Нет эффектов на частоту и длительность актов у мышей	[16]
Скополамин	1 мг/кг	Вб	Увеличение общей продолжительности груминга у мышей	
Бупренорфин	0.25 мг/кг	Вб	Увеличение общей продолжительности груминга у мышей	[17]
Клоназепам	0.25 мг/кг	Вб	Уменьшение общей продолжительности и частоты актов, а также задержки в процессе акта у крыс	[18]
ЛСД	0.32 мг/кг	Вб	Увеличение общей продолжительности груминга у мышей	[20]
Вальпроевая кислота	400 мг/кг	Подкожно	Увеличение общей продолжительности груминга у крыс	[15]

Изменение микроструктуры груминга

Кокаин + метилликаконитин	15 мг/кг + 5 мг/кг	Вб	Нарушение последовательности груминга у мышей, частое повторение коротких эпизодов	[22]
---------------------------	--------------------	----	--	------

Окончание таблицы 3.

Препарат	Доза	Способ введения	Эффект на груминг (вид)	Ссылки
Кортикостерон	20 мг/кг	Перорально	Увеличивает количество актов и время груминга, а также уменьшает латентность начала груминга, появляются неправильные переходы у мышей	[23]
Кортикостерон + кетамин	20 + 0.1 или 0.01 мг/кг	Перорально (по) + вб	Однократное введение кетамина и/или гуанозина нормализует ростральный груминг и прерванные и неправильные переходы, вызванные кортикостероном у мышей	
Кортикостерон + гуанозин + кетамин	20 + 0.01 + 0.1 мг/кг	По + по + вб	и неправильные переходы, вызванные кортикостероном у мышей	
Аллопрегнано-лон	1.25–5 мкг	Вб	Изменение процента правильных и неправильных переходов между стадиями у крыс	[19]

Табл. 3 иллюстрирует широкий спектр препаратов, которые демонстрируют активность при анализе груминга и его микроструктуры различными лабораториями мира. С помощью анализа микроструктуры груминга можно также сделать заключение о качестве лекарственного препарата. Например, при тестировании эффектов мелоксикама трех разных марок в тесте «открытое поле» на поведение мышей частота груминга снижается во всех трех группах, но особенно сильно выражена у одного препарата для ветеринарного применения. Эти побочные эффекты могут быть связаны с качеством лекарств, поскольку препараты мелоксикама могут содержать кристаллический полиморфизм, который влияет на эффективность и безопасность препаратов [25]. При введении липополисахарида (ЛПС) – эндотоксина, имитирующего инфекцию грамотрицательными бактериями, возникает аутистично-подобное поведение у потомства, в том числе повторяющийся груминг и другие моторные стереотипии [26]. Частота и длительность груминга головы увеличивается после пренатального воздействия ЛПС, также растут общая частота и время груминга на фоне снижения дофаминергической активности в гипоталамусе, что часто связывают с клиническими симптомами аутизма [26].

Помимо синтезированных веществ, активно изучаются растительные экстракты и эфирные масла с целью выявления их центрального (например, седативного или анксиолитического) профиля. Так, эфирное масло бергамота снижает тревожное поведение у крыс, подавляя общее количество актов груминга [27]. При этом флумазенил (антагонист бензодиазепинового сайта рецепторов гамма-аминомасляной кислоты ГАМК_A) не блокирует анксиолитический эффект эфирного масла бергамота [28]. Таким образом, седативное и анксиолитическое действие эфирного масла бергамота

реализуется через механизмы, не связанные с рецепторами ГАМК_A, что расширяет возможность использования веществ растительного происхождения в качестве анксиолитиков для животных. О возможной анксиолитичности также говорит влияние экстрактов валерианы (*Valeriana carnosa*, *V. macrorrhiza* и *V. clarionifolia*) на груминг [29], поскольку пероральное их введение снижает частоту ауто-груминга у мышей. Интересным эффектом обладает эфирное масло табака (*Nicotiana tabacum*) при разном способе введения [30]. Мыши в группе трансдермального введения тратят больше времени на груминг, чем группа ингаляционного введения, сохраняя при этом правильную микроструктуру. Полученные данные говорят об актуальности анализа груминга и его микроструктуры для поиска новых анксиолитических и других психотропных агентов среди растительных лекарственных средств и их сравнения с классическими анксиолитиками.

ГРУМИНГ В ОТДЕЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ НАРУШЕНИЙ ЦНС

Оценка микроструктуры груминга важна при исследовании заболеваний ЦНС, например, обсессивно-компульсивного расстройства (ОКР) и аутизма. Так, при хроническом применении кокаина появляются стереотипии и подобные ОКР эффекты [22], например, повторяются короткие последовательности груминга, что указывает на стрессорную природу наблюдаемого поведения и на вероятную роль $\alpha 7$ -субъединицы никотинового рецептора ацетилхолина (nAChR) в модуляции ОКР-подобного эффекта кокаина. Повышенный груминг с чрезмерно повторяющимися паттернами часто встречается в животных моделях расстройств тревожного спектра и ОКР. Возможной причиной такого поведения является повышенная передача сигналов метаботропного глутаматного рецептора 5 (mGluR5), которая приводит к нарушению поведения и активности стриатума [31]. Нарушения могут возникнуть и в биохимических процессах. Например, дефицит Zfp462, белка цинковых пальцев, специфичного для позвоночных, вызывает у мышей тревожное поведение с чрезмерным грумингом [32] – повышением числа актов груминга и процента прерванных актов. Мыши с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом проявляют чрезмерный груминг с характерными паттернами, присущими ОКР – их груминг носит ригидный характер с повышенным количеством стереотипно повторяющихся действий [33].

В ряде моделей социальная среда улучшает поведение и нормализует груминг по сравнению с контрольными группами. Например, у самок мышей с гаплонедостаточностью тирозингидроксилазы снижается уровень катехоламинов и наблюдаются поведенческие аномалии – ухудшение сенсомоторных способностей, усиление тревожно-подобного поведения и нарушения микроструктуры груминга [34]. Однако если ссадить таких мышей с контрольными, то снижается частота и количество груминга, что свидетельствует о положительном влиянии совместного проживания (вероятно, за счет социального трансфера или обогащения среды).

В последнее время уделяется большое внимание исследованию генов и возможных генетических нарушений при оценке груминга и его микроструктуры. В частности, груминг грызунов чувствителен к различным генетическим манипуляциям, в т. ч. мутациям и трансгенезу. Подробный перечень генетически модифицированных мышей с нарушением груминга и его микроструктуры содержится в Базе данных геномной информатики мышей (Mouse Genomics Informatics Database, www.informatics.jax.org/), поддерживаемой Джексоновской лабораторией (США). На сегодняшний день в ней содержится наиболее полная информация о десятках линий геномодифицированных мышей с нарушениями груминга и его поведенческой микроструктуры.

Некоторые из данных линий будут рассмотрены ниже в качестве иллюстративных примеров. Так, ген *Shank3B* кодирует постсинаптические каркасные белки, которые имеют решающее значение для синаптической функции в мозге [35]. Мыши с нока-

утом этого гена демонстрируют типичные для расстройства аутистического спектра (РАС) поведенческие отклонения, включая стереотипный груминг и повышенную тревожность [36]. Самцы мышей с делецией домена PDZ (экзоны 13–16) *Shank3* демонстрируют фенотип поведения, подобный РАС, с часто прерывающимся повторяющимся грумингом и aberrантными социальными взаимодействиями [37]. При удалении экзонов 4–9 (*Shank3^{ex4-9}*), специфичных для изоформы этого гена, мыши демонстрируют аномальное социальное поведение и стереотипно повторяющиеся стадии груминга [38]. Кроме того, мыши *Shank3^{Δex4-22/-}* с делецией экзонов 4–22 демонстрируют чрезмерный длительный груминг на фоне снижения уровня стриарных постсинаптических каркасных белков mGluR5-Homer, измененной передачи сигналов mGluR5 в стриатуме и аномалий кортико-стриарного пути [39]. РАС-подобный фенотип описан и у мышей, нокаутных по гену $\alpha 2$ -субъединицы натриевого канала (*Scn2a*), связанного с эпилепсией и аутизмом в клинике, демонстрируя повышение частоты груминга и появление других поведенческих стереотипий (например, в тесте закапывания мраморных шариков в подстилку) [40].

Похожие эффекты возникают у мышей с генетическим дефицитом дофамин- β -гидроксилазы (*Dbh*^{-/-}), который необходим для превращения дофамина в норадреналин, что приводит к повышению уровня первого и отсутствию последнего [41]. В отличие от контрольной группы, которая демонстрирует энергичное зарывание в ответ на предъявление незнакомого им запаха розы, мыши *Dbh*^{-/-} демонстрируют частые и длительные акты повторяющегося груминга. Таким образом, по-видимому, норадреналин управляет зарыванием, вызванным стрессом, а дофамин, очевидно, контролирует поведение и микроструктуру груминга.

Потенциальные мишени трансляции, которые связаны с поведенческими фенотипами, были описаны и валидированы *in-silico* на основании открытых баз данных [42]. Так, описано более 30 генов, гомологичных у мышей и человека, в т.ч. *Ptpra*, *Tubgcp4*, *Til*, *Ptger3*, *Hoxb4*, *Pdgfb* и *Faah*, коррелирующие с грумингом сразу в ряде поведенческих тестов [43]. Гены *Hoxb4* и *Hoxb8* участвуют в импульсивном груминге и ОКР-подобном поведении, а *Ptpra* связан с шизофренией. Интересен также ген *Cncd2*, связанный с аномальной морфологией мозжечка и *Gnb5*, поскольку мыши с нокаутом *Gnb5* имеют аномальное развитие мозжечка и нарушение координации движений [42]. Выявлены также гены молекул адгезии клеток нейронов (нейрексыны, нейролигины, *CNTNAP*), белков постсинаптического каркаса (*Shanks*, *SAPAP*), рецепторов нейромедиаторов (глутамата, ГАМК) и молекул, участвующих в синтезе белка в мозге (*Fmr1*, *TSC*, *MeCP2*) [44]. Исследование генов значимо для понимания микроструктуры груминга, потому что оно раскрывает молекулярные механизмы в основе этого сложного и высокоорганизованного поведения. Это может помочь исследовать нейрофенотипы, связанные с грумингом, а также выявить новые мишени для лечения нейropsychических расстройств, таких как ОКР, синдром дефицита внимания и гиперактивности, шизофрения и аутизм.

РОЛЬ ОТДЕЛОВ ЦНС В РЕГУЛЯЦИИ ГРУМИНГА

Из основных зон мозга, ответственных за груминг, особо важную роль играют кора головного мозга, базальные ганглии, гипоталамус, миндалина, мозжечок, и продолговатый мозг [1] (рис. 3, табл. 4). Груминг грызунов и его организация зависят от базальных ганглиев, в частности, от связи дофаминовых нейронов [45]. Кора головного мозга, таламус и миндалевидное тело регулируют груминг, посылая и получая сигналы в стриатум. Мозжечок координирует и настраивает движения груминга, имея проекции в разные части головного и спинного мозга. Миндалевидное тело влияет на груминг в зависимости от контекста (например, при стрессе или в рамках социальной активности).

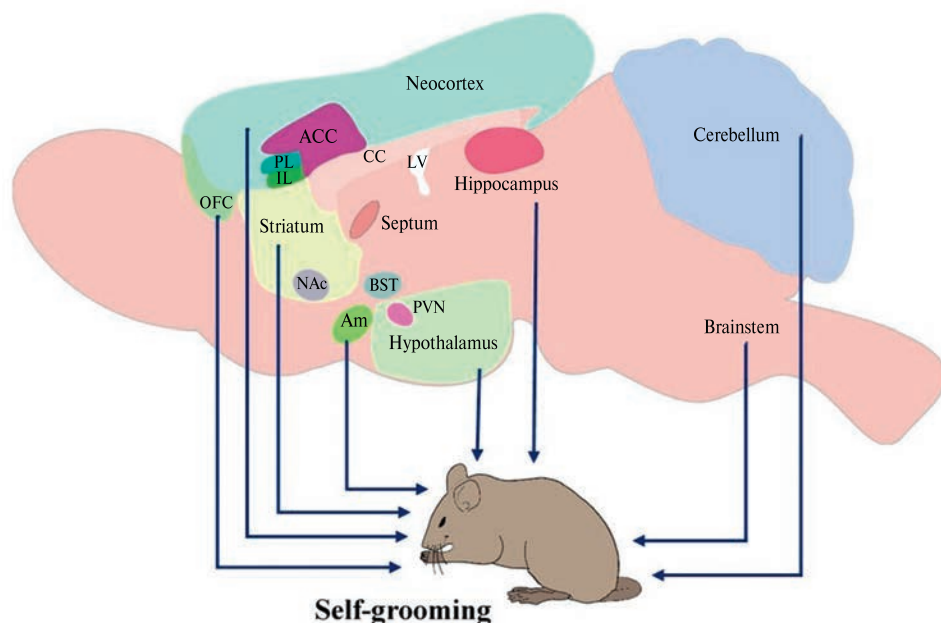


Рис. 3. Мозговые структуры, вовлеченные в регуляцию груминга и его микроструктуры у грызунов (см. также табл. 4) [1]. ACC – передняя поясная кора, PL – prelimбическая кора, IL – инфраламбическая кора, OFC – орбитофронтальная кора, CC – мозолистое тело, LV – боковой желудочек, NAc – прилежащее ядро, BST – ядро ложа терминальной полоски, Am – миндалина, PVN – паравентрикулярное ядро гипоталамуса. Стриатум регулирует последовательное движение грызунов при ауто-груминге, в то время как неокортекс участвует в общей модуляции двигательной программы. Мозжечок играет важную роль в контроле, координации и тонкой настройке движений при ауто-груминге, а ствол мозга – в инициации данных движений. Например, специфические нейроны спинального ядра тройничного нерва образуют нейронную цепь с шейным отделом спинного мозга для поддержания повторяющегося орофациального ауто-груминга. Миндалина участвует в специфической модуляции ауто-груминга во время стрессовых ситуаций, а гипоталамус обуславливает нейроэндокринную регуляцию груминга посредством гипоталамо-гипофизарной системы, либо через активацию других нейронных цепей. Например, стимуляция нейронов паравентрикулярного ядра и дорсального гипоталамуса вызывает активный ауто-груминг.

Гипоталамус и гипофиз отвечают за общий гормональный контроль груминга (рис. 3), активируя его при выделении стрессорных пептидов кортиколиберина и адренотропного гормона [46]. Ствол мозга иницирует и формирует базовые паттерны груминга (рис. 1), но для их полного выражения нужен стриатум. Также была доказана связь гиппокамп-септум-гипоталамус в лимбической системе мозга грызунов, которая регулирует ауто-, но не гетеро-груминг [47]. Активность мозга при груминге также демонстрирует интересные региональные особенности. Например, для нескольких областей мозга характер активации нейронов при груминге у самок в период диэструса различен в одних областях мозга, (околоводопроводное серое вещество, латеродорсальное тегментальное ядро, вентромедиальное дорсальное ядро шва), но не менялся в других (базальное ядро Мейнберта, оболочка прилежащего ядра) [48].

Таблица 4. Нейробиологический субстрат груминга при стрессе и моделях ОКР

Зона мозга	Экспрессия <i>c-fos</i>		Ссылки
	при стрессе	при ОКР	
Кора головного мозга	↑	↑	[49]
Передняя поясная кора		↑	[50]
Прелимбическая кора		↑	[50]
Инфралимбическая кора		↑	[50]
Орбитофронтальная кора	↑	↑	[36, 50]
Ядро ложа терминальной полоски		↑	[50, 51]
Прилежащее ядро	↑	↑	[48, 50]
Базальное ядро Мейнерта	↑		[48]
Гипоталамус	↑	↑	[49, 50]
Миндалина	↑	↑	[36, 49, 50]
Околоводопроводное серое вещество	↑		[48]
Вентромедиальное дорсальное ядро шва	↑		[48]
Латеродорсальное тегментальное ядро	↑		[48]
Голубое пятно	↑		[48]
Околоводопроводное серое вещество	↑		[36, 48]
Медиальное ядро таламуса	↑		[36]

В табл. 4 отображены основные отделы мозга и их структуры, которые активируются при стрессе или ОКР. Заметно, что при обоих адаптационных расстройствах активируются одинаковые структуры. Неслучайно при ОКР, помимо повторяющихся действий, возникают также стрессовые состояния, которые отображаются в поведенческих тестах и стереотипном груминге. Такое поведение также связано с повышенной активностью нейронов в различных областях мозга, таких как орбитофронтальная кора, передняя поясная кора, прелимбическая кора, инфралимбическая кора, прилежащее ядро и гипоталамус. Эти области мозга участвуют в регуляции эмоций, мотивации и принятии решений и могут быть дисрегулированы при ОКР и стрессе [52, 53]. Таким образом, ОКР и стресс могут иметь общие механизмы, влияющие на поведение и работу мозга грызунов. В целом изучение груминга в контексте вовлеченных отделов мозга (рис. 3) имеет большое значение, помогая лучше понять неврологические расстройства, которые вызывают повторяющееся поведение. Кроме того, возможно, что зоны мозга, которые отвечают за груминг как инстинктивное поведение, могут быть связаны с другими видами поведения и мышления, которые развились у человека в процессе эволюции и культуры [1].

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОСТРУКТУРЫ ГРУМИНГА

Количественная оценка груминга и его микроструктуры открывает новые возможности в нейробиологии за счет создания и стандартизации компьютерных программ, существенно повышающих качество нейрофенотипирования поведения грызунов. В частности, созданы методы автоматического анализа микроструктуры груминга с помощью коммерческих программ HomeCageScan (CleverSys, Inc., США) и Ethovision XT7 (Noldus

IT BV, Нидерланды), а также доступных в открытом доступе программ JAABA (Howard Hughes Medical Institute, США) [54–56], автоматический подсчет актов груминга в которых имеет одинаковую ошибку с ручным подсчетом, это говорит о том, что дальнейшие методические разработки в области технологий видеослежения позволят свести к минимуму количество ложных обнаружений, повысив эффективность данного метода. M-Track (CCTV Products, Пакистан), позволяющий в автоматическом режиме определять микрогруминг [57], представляет собой удобный графический интерфейс и надежный алгоритм для точного отслеживания движений отдельных передних лап во время спонтанного груминга. Создано также программное обеспечение DeepEthogram (Harvard Medical School, Boston, США), которое использует контролируемое машинное обучение для преобразования необработанных пикселей видео в этограмму для каждого видеокadra [58].

С использованием данных подходов в литературе описаны функции и представлен пространственно-временной подход глубокого обучения для классификации поведения мышей в домашней клетке [59]. Используя новую архитектурную модель нейронной сети, изучена генетика, лежащая в основе поведения, чтобы объяснить, почему мыши демонстрируют различное поведение при груминге [60]. Например, нейросетевой алгоритм проанализировал 2250 ч видео с участием более 60 разновидностей мышей и других животных, показав, что мыши, выращенные в лаборатории, занимаются грумингом меньше, чем мыши, недавно выловленные в природе. Похожим по функционалу, но чуть менее точной является трехмерная сверточная нейронная сеть (3D-CNN), в которой анализируются всего три параметра – отсутствие ауто-груминга (0), груминг морды (1) и груминг тела (2) [61]. Однако такой подход существенно выигрывает с точки зрения производительности и скорости обработки данных. Автоматизация позволяет проводить 24-часовую видеозапись ауто- и гетеро-груминга животных в более естественных условиях, исключая дополнительные стрессовые факторы, что предоставляет очевидные преимущества для нейроповеденческих исследований, так как упрощает работу исследователя и представляет более полную картину поведения животного. Таким образом, приведенные выше сведения еще раз указывают на значимость груминга и при действии различных экспериментальных факторов. При этом в ряде исследований [55, 56] анализ микроструктуры груминга являлся более чувствительным методом, чем общий подсчет его продолжительности (который либо не менялся, либо нет – см. далее).

Более того, использование анализа микроструктуры не ограничивается исследованием груминга грызунов и может быть применено для анализа поведения других видов животных, а также человека (в т.ч. в клинике). Например, инструменты видеонаблюдения в настоящее время позволяют отслеживать несколько животных на одной площадке [60], что открывает возможность изучения социального поведения, аллогруминга и, вероятно, может быть использовано для исследования аутизма. Также перспективным является использование искусственного интеллекта (ИИ), который будет способен к самостоятельному обучению и сможет точно отслеживать изменение поведения животного в естественной для него среде. Это позволит выделить даже тонкие изменения в поведении, которые могут быть связаны с психологическими нарушениями, а также выявить новые закономерности в физиологии животных. Кроме того, применение алгоритмов машинного обучения может помочь в выявлении скрытых паттернов в микроструктуре груминга, связанных с конкретными нарушениями ЦНС – ОКР, аутизмом и депрессией (табл. 4). Это приведет к углубленному пониманию механизмов и особенностей поведения у мышей, что может пролить свет на возможные связи между молекулярными, нейробиологическими и поведенческими аспектами этих нарушений. Поскольку поведение груминга характерно не только для грызунов и обнаруживается у самых различных видов животных, включая приматов и человека [62], трансляционная значимость груминга может быть также высокой в контексте диагностики различных (в том числе пресимтомальных и коморбидных) заболеваний ЦНС. Существует также целый ряд других открытых вопросов для изучения в данной области (табл. 5).

Таблица 5. Отдельные открытые вопросы в области анализа микроструктуры груминга грызунов

Вопросы

- Какие нейрофармакологические агенты могут модулировать груминг и как они влияют на активность и пластичность нейронов в стриатуме и других областях головного мозга?
- Какие этиологические факторы могут способствовать развитию повышенного груминга у животных и людей? Какие молекулярные и генетические маркеры могут быть ассоциированы с повышенным грумингом у животных и людей?
- Какие эволюционные преимущества или недостатки может иметь повышенный ауто-груминг у животных в естественных условиях?
- Как ауто-груминг грызунов коррелирует с гетеро-грумингом? Имеются ли общие нейрональные субстраты данных форм поведения?
- Как ауто-груминг грызунов коррелирует с ауто-барберингом? Имеются ли общие нейрональные субстраты данных форм поведения?
- Какие теоретические и практические применения может иметь анализ груминга для понимания нейробиологии, психологии и поведения животных и людей, в т. ч. аффективных расстройств, социального взаимодействия, формирования навыков и привычек, а также эволюционной адаптации?
- Какие функции выполняют разные зоны мозга, ответственные за груминг, и как они координируются между собой? [63]
- Почему груминг грызунов зависит от связи дофаминовых нейронов в базальных ганглиях и как это отражается на их поведении и когнитивных способностях? [64]
- Какие факторы могут вызывать или усиливать повторяющееся или стереотипное поведение, связанное с грумингом, такое как ОКР, аутизм или депрессия, и как они диагностируются и лечатся у животных и людей?
- Изменяется ли микроструктура груминга в зависимости от возраста и пола?
- Как поможет искусственный интеллект (ИИ) при распознавании микроструктуры груминга? Например, как применить ИИ и анализ больших данных (big data) для более точной диагностики, классификации и прогнозирования депрессии, аутизма, ОКР и других?
- Возможно ли в будущем провести параллель между микроструктурой груминга и сложным поведением человека?
- Самцы, при эрекции полового члена, больше уделяют внимание грумингу генитальной области [65]. Как не ошибиться при статистической обработке и не посчитать этот акт как количество неправильных переходов?
- Как молекулярные и генетические маркеры ауто-груминга могут быть использованы для скрининга или прогнозирования риска развития нарушений ЦНС человека?
- Лабораторные мыши занимаются грумингом меньше, чем дикие [60]. Как это связано с процессами domestikации? Связано ли это с возможной повышенной тревожностью лабораторных мышей?

Вопросы

- Какое место среди различных форм груминга занимает чесание тела задней лапой? В настоящее время оно рассматривается как отдельный вид поведения (т.е. вне паттернов остального груминга, в котором участвует вылизывание или облизывание, рис. 1).
- Как головной мозг координирует свои действия со спинным мозгом, генерируя двигательные действия, участвующие в груминге?
- Нейроны $Cbln2^+$ Sp5C являются ключевым подтипом нейронов, отвечающим за повторяющийся груминг орофациальной поверхности [66]. Какие существуют еще нейроны и могут ли они отвечать за полную структуру груминга?
- Как влияет генетический профиль линии дикого типа на эффект мутаций, влияющих на груминг, с учетом известных линейных различий в отношении ауто-груминга и его микроструктуры?
- Существует ли эпигенетическая регуляция ауто-груминга? Какие эпигенетические механизмы могут вовлекаться в данный процесс?
- Каково участие нейроглии (микроглии и астроцитов) в регуляции ауто-груминга?
- Связаны ли между собой патологический ауто-груминг и апоптоз, нейровоспаление и нейродегенерация?
- Как ранний (неонатальный) стресс влияет на ауто-груминг и его микроструктуру?
- Какова возрастная траектория ауто-груминга и его микроструктуры?
- Влияет ли на микроструктуру ауто-груминга экспериментальная девибриссация и деольфактация (аносмия)?
- Участвуют ли феромоны (и какие) в регуляции ауто-груминга?
- Вокализируют ли грызуны до, во время и после ауто-груминга, и как?
- Каково соотношение генетических и средовых факторов в регуляции груминга и его микроструктуры? Например, изменяются ли последние при кросс-фостеринге, когда мышата линий с активным грумингом выращиваются приемными матерями линий с низким уровнем, и наоборот?
- Как коррелируют генетические и эпигенетические детерминанты «количества» груминга с таковыми для его «качества» (микроструктуры)?
- Существует ли «социальный перенос» изменений в микроструктуре ауто-груминга у лабораторных грызунов?
- Как отличается микроструктура ауто-груминга у лабораторных мышей и крыс? Какие могут быть нейрональные механизмы данных различий, если они есть?
- Возможно ли ИИ научить определять все вариации поведения грызунов – разные виды груминга, барберинг, гнездование, рытье нор, исследование незнакомой местности и т.д.?
- Возможно ли адаптировать Алгоритм анализа груминга (ААГ) для оценки ауто-груминга человека в домашних, рабочих и клинических условиях?

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОСТРУКТУРЫ ГРУМИНГА

Более того, помимо ауто- и гетеро-груминга, в поведении грызунов важную роль занимает этологически близкое ему поведение барберинга [67–75]. Барберинг представляет собой поведенчески обусловленную алопецию (выкусывание шерсти и вибрисс), часто наблюдаемую у лабораторных грызунов. Как и для груминга, описаны ауто- и гетеро-барберинг [67–73]. В литературе активно обсуждается биологическая роль и взаимосвязь барберинга со стрессом, агрессией, грумингом и аберрантным стереотипным поведением. И хотя накапливающиеся сведения указывают на то, что ауто-барберинг представляет собой отдельный фенотип [69–73], можно допустить его частичное перекрытие на поведенческом, физиологическом и нейросубстратном уровнях с патологически повышенным ауто-грумингом (например, *overgrooming*). Поэтому понимание природы барберинга и груминга и их влияния на состояние лабораторных животных является важным фактором, который необходимо учитывать в экспериментальной работе (табл. 5).

Патологически повышенный ростральный ауто-груминг может также привести к полной или частичной девибриссации (например, как в случае с мышами-мутантами по гену *Hoxb8* [76]). Поскольку девибриссация влияет на поведение мышей в ряде тестов, это может исказить интерпретацию результатов эксперимента [67]. Например, девибриссация является экспериментальной моделью анксиогенеза у грызунов и приводит к нарушению их исследовательского поведения [77]. Таким образом, девибриссация при патологическом ауто-груминге, как и при ауто-барберинге, может усилить тревогу грызунов в поведенческих тестах, неспецифически влияя на результаты исследований, что особенно важно учитывать в контексте озабоченности научного сообщества проблемой воспроизводимости поведенческих данных в лабораториях [78, 79]. Соответственно становятся важными также систематические исследования распространенности нормального и патологического груминга в лабораторных колониях, как это уже делается для барберинга [68, 74, 80], а также поиск путей его нормализации, например, путем обогащения среды содержания животных в условиях вивария.

Необходимо также исследование ряда других аспектов ауто-груминга в лабораторных условиях. Например, уровень груминга зависит от условия содержания животных, в том числе таких факторов, как транспортировка в виварий, смена комнат вивария, время суток, время года [60]. Однако влияние данных и ряда других феноменных факторов (уровень освещения, шума и вибрации в виварии, его размер, цвет стен, размер и тип клеток, плотность содержания животных, система вентиляции клеток, тип подстилки, режим ее смены, положение клетки на полке, источник/поставщик лабораторных животных, наличие сублиний, тестирование в различных лабораториях [74, 81]) на микроструктуру груминга пока не изучено. Влияние экспериментатора (его присутствие или отсутствие при тестировании, пол, метод хэндлинга животных) на поведение лабораторных грызунов также описано в литературе [82–84], но пока не изучено в контексте количественных или микроструктурных показателей груминга. Анализ различных поведенческих показателей ауто-груминга [60] может включать также ковариацию количественных и качественных (микроструктурных) параметров ауто-груминга различных линий и генетически модифицированных моделей. Это позволит понять, насколько увеличение или снижение частоты и длительности актов груминга может коррелировать с нарушением микроструктуры или предсказывать его, а также позволит оценить, насколько перекрываются генетические детерминанты двух данных характеристик ауто-груминга. Роль индивидуальной вариации микроструктуры ауто-груминга как отдельном фенотипе также заслуживает внимания в будущих нейробиологических исследованиях, особенно в контексте корреляции и ковариации с другими (не-груминговыми) нормальными и аберрантными фенотипами, изучаемыми в эксперименте.

Еще один важный практический вопрос касается влияния генетического профиля линии дикого типа на эффект мутаций, влияющих на груминг (табл. 5). Например, извест-

ны выраженные линейные различия в отношении количества [60] и микроструктуры ауто-груминга у мышей [8, 9], которые могут накладываться на изменения груминга, вызываемые генетическими модификациями. Поэтому исследователи должны оценивать вероятность возникновения эффектов «потолка» и «пола», например, если активирующая груминг мутация вызывается у линии дикого типа с высоким уровнем данного поведения, а ингибирующая мутация – у линии с крайне низким его уровнем соответственно.

Следует также отметить, что в большинстве работ (табл. 3, 6) оценка поведения животных проводилась не в комфортных условиях домашней клетки, а в различных поведенческих тестах (чаще всего основанных на стрессе новизной), и поэтому полная программа груминга могла не проявиться за счет преобладания незавершенных актов «стрессорного» груминга. С другой стороны, экспериментальные животные сравниваются с контрольной группой, которая содержится и тестируется в тех же условиях. В эксперименте также может быть целесообразно регистрировать разные формы поведения (обычно анализируемые раздельно, в специальных тестах) в ходе одного опыта, для сокращения времени тестирования и снижения риска ложных позитивов и негативов. Например, для анализа груминга могут использоваться видеозаписи, полученные не специально в отдельном тесте на груминг, а записанные в тестах открытого поля или приподнятого крестообразного лабиринта. Это логичное решение позволяет за один эксперимент получить несколько наборов данных (включая груминг) для их последующего анализа, что (за счет оптимизации дизайна эксперимента) также соответствует принципам биоэтичного экспериментирования на животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом ауто-груминг лабораторных грызунов является чувствительным и широко распространенным поведенческим фенотипом в биомедицинских и нейробиологических исследованиях. Для анализа ауто-груминга важна не только оценка его количества, но и анализ тонкой поведенческой микроструктуры, которая, как показывают данные последних лет, также оказывается чувствительна к широкому спектру экспериментальных воздействий (рис. 1–2, табл. 3). В ряде случаев чувствительность к различным экспериментальным воздействиям у микроструктуры груминга оказывается не ниже, а иногда – выше и с большим числом эффектов (табл. 6), чем у традиционных методов количественной оценки данного поведения. Поэтому необходимо более полно изучать груминг в контексте его микроструктуры и активно включать методы его комплексной оценки в существующие протоколы доклинических испытаний на грызунах.

Таблица 6. Примеры эффективности микроструктурного анализа груминга грызунов в нейробиологических исследованиях

Воздействие (вид)	Эффект на микроструктуру	Традиционные количественные подходы к оценке груминга	Ссылки
Клоназепам (крысы)	Уменьшение количества общих переходов между стадиями, что приводит к уменьшению количества неправильных и правильных переходов и росту процента правильных переходов. Уменьшение количества стадий, но увеличение продолжительности каждого эпизода и количеств стадий в эпизоде	Увеличение латенции, снижение частоты и общей продолжительности груминга	[18]

Продолжение таблицы 6.

Воздействие (вид)	Эффект на микроструктуру	Традиционные количественные подходы к оценке груминга	Ссылки
Нокаут гена <i>Shank3B</i> (мышь)	Увеличение груминга морды и тела, хаотичные переходы между данными стадиями	Увеличение общей продолжительности, но не частоты актов груминга	[36]
Введение липополисахарида (крысы)	Появление стереотипий, увеличение «рострального» груминга головы	Увеличение общей продолжительности и частоты актов груминга	[26]
Хронический аутоиммунный энцефаломиелит (мышь)	Увеличение груминга морды и головы, уменьшение количества неправильных переходов между стадиями (более ригидный груминг)	Увеличение общей продолжительности груминга	[33]
Введение Th-17-лимфоцитов (мышь)	Увеличение груминга морды и головы, уменьшение количества неправильных переходов между стадиями (более ригидный груминг)	Увеличение общей продолжительности груминга	[33]
Инбредная линия BTBR (мышь)	Появление поведенческих стереотипий, увеличение продолжительности груминга головы, тела, лап, хвоста и гениталий. Увеличение процента прерванных эпизодов и снижение процента неправильных переходов между стадиями	Увеличение общей продолжительности, но не частоты актов груминга	[85]
Аллопрегнанолаон (крысы)	Уменьшение процента правильных переходов (возможное стрессорное поведение)	Частота и продолжительность груминга не изменяется	[19]
Нокаут рецептора 1, связанного со следовыми аминами (TAAR1, мышь)	Снижение каудального и рострального груминга, уменьшение количества неправильных переходов между стадиями, снижение груминга головы, тела и хвоста	Снижение частоты груминга	[86]
Депривация сна (крысы)	Увеличение частоты неправильных переходов между стадиями	Нет различий с контролем	[10]

Окончание таблицы 6.

Воздействие (вид)	Эффект на микроструктуру	Традиционные количественные подходы к оценке груминга	Ссылки
Депривация парадоксального сна (крысы)	Увеличение частоты неправильных переходов и полных переходов. Увеличение частоты всех стадий, кроме груминга тела	Увеличение частоты и общей продолжительности груминга	[10]
Депривация сна у кормящих самок (крысы)	Увеличение числа неправильных переходов между стадиями	Увеличение частоты груминга у самок вне гнезда с потомством*	[12]
Нокаут гена триптофан-гидроксилазы (крысы)	Снижение доли правильных переходов между стадиями при интактном общем региональном распределении груминга	Нет различий в частоте и продолжительности груминга*	[87]

*На фоне отсутствия изменений поведенческих показателей тревожности в тесте приподнятого крестообразного лабиринта

Изучение микроструктуры ауто-груминга позволяет также оценивать многие другие аспекты поведения животных – двигательную активность, когнитивные функции, эмоции, стресс и социальность. Эти аспекты имеют большое значение для понимания механизмов ЦНС, а также для выявления потенциальных ее нарушений и заболеваний. Микроструктура груминга может служить индикатором нормального или аномального поведения, а также показателем эффективности терапевтических вмешательств. С этой точки зрения изучение микроструктуры груминга и ее нейрофизиологических и молекулярных коррелятов является важным подходом в современных нейробиологических исследованиях ЦНС (табл. 5).

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея статьи (А. В. К.), подготовка черновика статьи (К. В. А., А. Д. Ш., А. Д. В.), иллюстрации (В. Д. Р., С. В. А.), обсуждение и подготовка итоговой версии рукописи (А. В. К., К. В. А., А. Д. Ш., М. К. М., В. Д. Р., С. В. А., А. Д. В.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Научно-технического университета «Сириус». 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. *Kalueff AV, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC* (2016) Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 17(1): 45–59. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
2. *Klenowski PM, Zhao-Shea R, Freels TG, Molas S, Zinter M, M'Angale P, Xiao C, Martinez-Núñez L, Thomson T, Tapper AR* (2023) A neuronal coping mechanism linking stress-induced anxiety to motivation for reward. *Sci Adv* 9(49): eadh9620. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adh9620>
3. *Estanislau C, Veloso AWN, Filgueiras GB, Maio TP, Dal-Cól MLC, Cunha DC, Klein R, Carmona LF, Fernández-Teruel A* (2019) Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and perseveration: Evidence for a self-grooming trait. *Physiol Behav* 209: 112585. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112585>
4. *Kalueff AV, Aldridge JW, LaPorte JL, Murphy DL, Tuohimaa P* (2007) Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nat Protoc* 2(10): 2538–2544. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.367>
5. *Petković A, Chaudhury D* (2022) Encore: Behavioural animal models of stress, depression and mood disorders. *Front Behav Neurosci* 16: 931964. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.931964>
6. *Smolinsky AN, Bergner CL, LaPorte JL, Kalueff AV* (2009) Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression. In: Gould TD (ed) *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests*. Totowa, NJ. Humana Press. 21–36.
7. *Kalueff AV, Tuohimaa P* (2005) The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *J Neurosci Methods* 143(2): 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.001>
8. *Kalueff AV, Tuohimaa P* (2005) Contrasting grooming phenotypes in three mouse strains markedly different in anxiety and activity (129S1, BALB/c and NMRI). *Behav Brain Res* 160(1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.11.010>
9. *Kalueff AV, Tuohimaa P* (2004) Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res Protoc* 13(3): 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2004.04.002>
10. *Pires GN, Tufik S, Andersen ML* (2013) Grooming analysis algorithm: use in the relationship between sleep deprivation and anxiety-like behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 41: 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.11.006>
11. *Pires GN, Tufik S, Andersen ML* (2015) Effects of REM sleep restriction during pregnancy on rodent maternal behavior. *Braz J Psychiatry* 37(4): 303–309. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2014-1629>
12. *Pires GN, Tufik S, Andersen ML* (2020) Effects of sleep restriction during pregnancy on postpartum maternal behavior in female rats. *Behav Proc* 179: 104200. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104200>
13. *Enginar N, Hatipoğlu I, Firtina M* (2008) Evaluation of the acute effects of amitriptyline and fluoxetine on anxiety using grooming analysis algorithm in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 89(3): 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.02.001>
14. *Salat K, Gdula-Argasińska J, Malikowska N, Podkowa A, Lipkowska A, Librowski T* (2016) Effect of pregabalin on contextual memory deficits and inflammatory state-related protein expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 389(6): 613–623. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1230-x>
15. *Wang R, Hausknecht K, Shen RY, Haj-Dahmane S* (2018) Potentiation of Glutamatergic Synaptic Transmission Onto Dorsal Raphe Serotonergic Neurons in the Valproic Acid Model of Autism. *Front Pharmacol* 9: 1185. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01185>
16. *Malikowska-Racia N, Podkowa A, Salat K* (2018) Phencyclidine and Scopolamine for Modeling Amnesia in Rodents: Direct Comparison with the Use of Barnes Maze Test and Contextual Fear Conditioning Test in Mice. *Neurotox Res* 34(3): 431–441. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9901-7>
17. *Robinson SA, Hill-Smith TE, Lucki I* (2019) Buprenorphine prevents stress-induced blunting of nucleus accumbens dopamine response and approach behavior to food reward in mice. *Neurobiol Stress* 11: 100182. <https://doi.org/10.1016/j.jynstr.2019.100182>

18. *Nin MS, Couto-Pereira NS, Souza MF, Azeredo LA, Ferri MK, Dalprá WL, Gomez R, Barros HM* (2012) Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. *Eur J Pharmacol* 684(1–3): 95–101.
<https://10.1016/j.ejphar.2012.03.038>
19. *Nin MS, Ferri MK, Couto-Pereira NS, Souza MF, Azeredo LA, Agnes G, Gomez R, Barros HM* (2012) The effect of intra-nucleus accumbens administration of allopregnanolone on δ and γ 2 GABA(A) receptor subunit mRNA expression in the hippocampus and on depressive-like and grooming behaviors in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 103(2): 359–366.
<https://10.1016/j.pbb.2012.09.002>
20. *Kyzar EJ, Stewart AM, Kalueff AV* (2016) Effects of LSD on grooming behavior in serotonin transporter heterozygous (Sert^{+/−}) mice. *Behav Brain Res* 296: 47–52.
<https://10.1016/j.bbr.2015.08.018>
21. *Yao Z, Zhang BX, Chen H, Jiang XW, Qu WM, Huang ZL* (2023) Acute or Chronic Exposure to Corticosterone Promotes Wakefulness in Mice. *Brain Sci* 13(10).
<https://10.3390/brainsci13101472>
22. *Metaxas A, Keyworth H, Yoo J, Chen Y, Kitchen I, Bailey A* (2012) The stereotypy-inducing and OCD-like effects of chronic 'binge' cocaine are modulated by distinct subtypes of nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol* 167(2): 450–464.
<https://10.1111/j.1476-5381.2012.02023.x>
23. *Camargo A, Dalmagro AP, Fraga DB, Rosa JM, Zeni ALB, Kaster MP, Rodrigues ALS* (2021) Low doses of ketamine and guanosine abrogate corticosterone-induced anxiety-related behavior, but not disturbances in the hippocampal NLRP3 inflammasome pathway. *Psychopharmacology* 238(9): 2555–2568.
<https://10.1007/s00213-021-05879-8>
24. *de Oliveira Mendes B, Mesak C, Calixto JED, Jr, Malafaia G* (2018) Mice exposure to haloxyfop-methyl ester at predicted environmentally relevant concentrations leads to anti-predatory response deficit. *Environ Sci Pollut Res Int* 25(31): 31762–31770.
<https://10.1007/s11356-018-3222-5>
25. *Antiorio AT, Alemán-Laporte J, Zanatto DA, Pereira MAA, Gomes MS, Wadt D, Yamamoto PK, Bernardi MM, Mori CM* (2022) Mouse Behavior in the Open-field Test after Meloxicam Administration. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 61(3): 270–274.
<https://10.30802/aalas-jaalas-21-000046>
26. *Kirsten TB, Bernardi MM* (2017) Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. *Behav Brain Res* 331: 25–29.
<https://10.1016/j.bbr.2017.05.013>
27. *Rombolà L, Tridico L, Scuteri D, Sakurada T, Sakurada S, Mizoguchi H, Avato P, Corasaniti MT, Bagetta G, Morrone LA* (2017) Bergamot Essential Oil Attenuates Anxiety-Like Behaviour in Rats. *Molecules* 22(4).
<https://10.3390/molecules22040614>
28. *Rombolà L, Scuteri D, Adornetto A, Straface M, Sakurada T, Sakurada S, Mizoguchi H, Corasaniti MT, Bagetta G, Tonin P, Morrone LA* (2019) Anxiolytic-Like Effects of Bergamot Essential Oil Are Insensitive to Flumazenil in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med: eCAM* 2019: 2156873.
<https://10.1155/2019/2156873>
29. *Marcucci C, Relats JMA, Bach HG, Kamecki F, Varela BG, Wagner ML, Pastore V, Coletti N, Ricco RA, Marder M* (2020) Neurobehavioral evaluation and phytochemical characterization of a series of argentine valerian species. *Heliyon* 6(12): e05691.
<https://10.1016/j.heliyon.2020.e05691>
30. *Xie D, Yao L, Huang Y, Wu S, Ma L, Li Y, Wang W* (2021) Anxiolytic Effect of Two Tobacco Essential Oils (*Nicotiana tabacum* Linn.) on Mice. *Molecules* 26: 14.
<https://10.3390/molecules26144171>
31. *Ade KK, Wan Y, Hamann HC, O'Hare JK, Guo W, Quian A, Kumar S, Bhagat S, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Conn PJ, Dzirasa K, Huber KM, Calakos N* (2016) Increased Metabotropic Glutamate Receptor 5 Signaling Underlies Obsessive-Compulsive Disorder-like Behavioral and Striatal Circuit Abnormalities in Mice. *Biol Psychiatry* 80(7): 522–533.
<https://10.1016/j.biopsych.2016.04.023>
32. *Wang B, Zheng Y, Shi H, Du X, Zhang Y, Wei B, Luo M, Wang H, Wu X, Hua X, Sun M, Xu X* (2017) Zfp462 deficiency causes anxiety-like behaviors with excessive self-grooming in mice. *Genes Brain Behav* 16(2): 296–307.
<https://10.1111/gbb.12339>

33. *Kant R, Pasi S, Suroli A* (2018) Auto-Reactive Th17-Cells Trigger Obsessive-Compulsive-Disorder Like Behavior in Mice With Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol* 9: 2508.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02508>
34. *Garrido A, Cruces J, Ceprián N, Hernández-Sánchez C, De Pablo F, De la Fuente M* (2021) Social Environment Ameliorates Behavioral and Immune Impairments in Tyrosine Hydroxylase Haploinsufficient Female Mice. *J Neuroimmune Pharmacol* 16(3): 548–566.
<https://doi.org/10.1007/s11481-020-09947-2>
35. *Guilmatre A, Huguet G, Delorme R, Bourgeron T* (2014) The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. *Dev Neurobiol* 74(2): 113–122.
<https://doi.org/10.1002/dneu.22128>
36. *Liu H, Huang X, Xu J, Mao H, Li Y, Ren K, Ma G, Xue Q, Tao H, Wu S, Wang W* (2021) Dissection of the relationship between anxiety and stereotyped self-grooming using the Shank3B mutant autistic model, acute stress model and chronic pain model. *Neurobiol Stress* 15: 100417.
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100417>
37. *Balaan C, Corley MJ, Eulalio T, Leite-Ahyo K, Pang APS, Fang R, Khadka VS, Maunakea AK, Ward MA* (2019) Juvenile Shank3b deficient mice present with behavioral phenotype relevant to autism spectrum disorder. *Behav Brain Res* 356: 137–147.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.08.005>
38. *Wang X, McCoy PA, Rodriguiz RM, Pan Y, Je HS, Roberts AC, Kim CJ, Berrios J, Colvin JS, Bousquet-Moore D, Lorenzo I, Wu G, Weinberg RJ, Ehlers MD, Philpot BD, Beaudet AL, Wetsel WC, Jiang YH* (2011) Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Hum Mol Genet* 20(15): 3093–3108.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddr212>
39. *Wang X, Bey AL, Katz BM, Badea A, Kim N, David LK, Duffney LJ, Kumar S, Mague SD, Hulbert SW, Dutta N, Hayrapetyan V, Yu C, Gaidis E, Zhao S, Ding JD, Xu Q, Chung L, Rodriguiz RM, Wang F, Weinberg RJ, Wetsel WC, Dzirasa K, Yin H, Jiang YH* (2016) Altered mGluR5-Homer scaffolds and corticostriatal connectivity in a Shank3 complete knockout model of autism. *Nat Commun* 7: 11459.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11459>
40. *Léna I, Mantegazza M* (2019) Na(V)1.2 haploinsufficiency in Scn2a knock-out mice causes an autistic-like phenotype attenuated with age. *Sci Rep* 9(1): 12886.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49392-7>
41. *Lustberg DJ, Liu JQ, Iannitelli AF, Vanderhoof SO, Liles LC, McCann KE, Weinshenker D* (2022) Norepinephrine and dopamine contribute to distinct repetitive behaviors induced by novel odorant stress in male and female mice. *Horm Behav* 144: 105205.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2022.105205>
42. *Roth A, Kyzar EJ, Cachat J, Stewart AM, Green J, Gaikwad S, O'Leary TP, Tabakoff B, Brown RE, Kalueff AV* (2013) Potential translational targets revealed by linking mouse grooming behavioral phenotypes to gene expression using public databases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 312–325.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.10.015>
43. *Ikrin A, Moskalenko A, Mukhamadeev R, Sander de Abreu M, Kolesnikova T, Kalueff A* (2023) The emerging complexity of molecular pathways implicated in mouse self-grooming behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 127: 110840.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110840>
44. *Gandhi T, Lee CC* (2020) Neural Mechanisms Underlying Repetitive Behaviors in Rodent Models of Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci* 14: 592710.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.592710>
45. *Obeso JA, Lanciego JL* (2011) Past, present, and future of the pathophysiological model of the Basal Ganglia. *Front Neuroanat* 5: 39.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00039>
46. *Muglia LJ, Jacobson L, Weninger SC, Karalis KP, Jeong K, Majzoub JA* (2001) The physiology of corticotropin-releasing hormone deficiency in mice. *Peptides* 22(5): 725–731.
[https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(01\)00385-0](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(01)00385-0)
47. *Mu MD, Geng HY, Rong KL, Peng RC, Wang ST, Geng LT, Qian ZM, Yung WH, Ke Y* (2020) A limbic circuitry involved in emotional stress-induced grooming. *Nat Commun* 11(1): 2261.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16203-x>
48. *Wiersielis KR, Wicks B, Simko H, Cohen SR, Khantsis S, Baksh N, Waxler DE, Bangasser DA* (2016) Sex differences in corticotropin releasing factor-evoked behavior and activated networks. *Psychoneuroendocrinology* 73: 204–216.
<https://doi.org/10.1016/j.psychneuen.2016.07.007>

49. Frank E, Salchner P, Aldag JM, Salomé N, Singewald N, Landgraf R, Wigger A (2006) Genetic predisposition to anxiety-related behavior determines coping style, neuroendocrine responses, and neuronal activation during social defeat. *Behav Neurosci* 120(1): 60–71.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.1.60>
50. Chen X, Yue J, Luo Y, Huang L, Li B, Wen S (2021) Distinct behavioral traits and associated brain regions in mouse models for obsessive-compulsive disorder. *Behav Brain Funct* 17(1): 4.
<https://doi.org/10.1186/s12993-021-00177-x>
51. van de Poll Y, Cras Y, Ellender TJ (2023) The neurophysiological basis of stress and anxiety – comparing neuronal diversity in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) across species. *Front Cell Neurosci* 2023: 17.
52. Mitra S, Bult-Ito A (2021) Bidirectional Behavioral Selection in Mice: A Novel Pre-clinical Approach to Examining Compulsivity. *Front Psychiatry* 2021: 12.
53. Chen X, Yue J, Luo Y, Huang L, Li B, Wen S (2021) Distinct behavioral traits and associated brain regions in mouse models for obsessive-compulsive disorder. *Behav Brain Funct* 17(1): 4.
<https://doi.org/10.1186/s12993-021-00177-x>
54. Kyzar E, Gaikwad S, Roth A, Green J, Pham M, Stewart A, Liang Y, Kobla V, Kalueff AV (2011) Towards high-throughput phenotyping of complex patterned behaviors in rodents: focus on mouse self-grooming and its sequencing. *Behav Brain Res* 225(2): 426–431.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.052>
55. Scruggs BA, Bowles AC, Zhang X, Semon JA, Kyzar EJ, Myers L, Kalueff AV, Bunnell BA (2013) High-throughput screening of stem cell therapy for globoid cell leukodystrophy using automated neurophenotyping of twitcher mice. *Behav Brain Res* 236(1): 35–47.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.020>
56. van den Boom BJG, Pavlidi P, Wolf CJH, Mooij AH, Willuhn I (2017) Automated classification of self-grooming in mice using open-source software. *J Neurosci Methods* 289: 48–56.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.026>
57. Reeves SL, Fleming KE, Zhang L, Scimemi A (2016) M-Track: A New Software for Automated Detection of Grooming Trajectories in Mice. *PLoS Comput Biol* 12(9): e1005115.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005115>
58. Bohoslav JP, Wimalasena NK, Clausen KJ, Dai YY, Yarmolinsky DA, Cruz T, Kashlan AD, Chiappe ME, Orefice LL, Woolf CJ, Harvey CD (2021) DeepEthogram, a machine learning pipeline for supervised behavior classification from raw pixels. *eLife* 10.
<https://doi.org/10.7554/eLife.63377>
59. Nwokedi EI, Bains RS, Bidaut L, Ye X, Wells S, Brown JM (2023) Dual-Stream Spatiotemporal Networks with Feature Sharing for Monitoring Animals in the Home Cage. *Sensors* 23(23).
<https://doi.org/10.3390/s23239532>
60. Geuther BQ, Peer A, He H, Sabnis G, Philip VM, Kumar V (2021) Action detection using a neural network elucidates the genetics of mouse grooming behavior. *eLife* 10.
<https://doi.org/10.7554/eLife.63207>
61. Sakamoto N, Kobayashi K, Yamamoto T, Masuko S, Yamamoto M, Murata T (2022) Automated Grooming Detection of Mouse by Three-Dimensional Convolutional Neural Network. *Front Behav Neurosci* 2022: 16.
62. Feusner JD, Hembacher E, Phillips KA (2009) The mouse who couldn't stop washing: pathologic grooming in animals and humans. *CNS Spectr* 14(9): 503–513.
<https://doi.org/10.1017/s1092852900023567>
63. Lee NS, Beery AK (2019) Neural Circuits Underlying Rodent Sociality: A Comparative Approach. *Curr Top Behav Neurosci* 43: 211–238.
https://doi.org/10.1007/7854_2018_77
64. Serafim AP, Felicio LF (2001) Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. *Rev Bras Pesqui Med Biol* 34(11): 1465–1470.
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2001001100015>
65. Dorantes-Nieto A, Cortes C, Ugarte A, Trujillo Hernández A, Carrasco Á, Cepeda-Freyre HA, Eguibar JR (2020) Yawning and Penile Erection Frequencies Are Resilient to Maternal Care Manipulation in the High-Yawning Subline of Sprague-Dawley Rats. *Front Behav Neurosci* 14: 20.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00020>
66. Xie Z, Li D, Cheng X, Pei Q, Gu H, Tao T, Huang M, Shang C, Geng D, Zhao M, Liu A, Zhang C, Zhang F, Ma Y, Cao P (2022) A brain-to-spinal sensorimotor loop for repetitive self-grooming. *Neuron* 110(5): 874–907.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.11.028>
67. Тур МА, Белозерцева ИВ (2017) Влияние спонтанной частичной сенсорной депривации на поведение самцов мышей линии C57BL/6N. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 103: 161–171. [Tur M, Belozertseva I (2017) Influence of spontaneous partial sensory deprivation on male C57BL/6N mice behavior. *Russ J Physiol* 103: 161–171. (In Russ)].

68. *Kalueff AV, Minasyan A, Keisala T, Shah ZH, Tuohimaa P* (2006) Hair barbering in mice: Implications for neurobehavioural research. *Behav Proc* 71(1): 8–15.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2005.09.004>
69. *Калыев АВ, Туохимаа П* (2005) Эффект Далилы в нейробиологических исследованиях. *Нейронауки* 1(1): 24–28. [*Kalueff AV, Tuohimaa P* (2005) The Dalila effects in neurobehavioural experiments. *Russ J Neurosci* 1(1): 24–28. (In Russ)].
70. *Sarna JR, Dyck RH, Whishaw IQ* (2000) The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behav Brain Res* 108(1): 39–45.
[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00137-0)
71. *Garner JP, Weisker SM, Dufour B, Mench JA* (2004) Barbering (fur and whisker trimming) by laboratory mice as a model of human trichotillomania and obsessive-compulsive spectrum disorders. *Compar Med* 54(2): 216–224.
72. *Rienecker KDA, Chavasse AT, Moorwood K, Ward A, Isles AR* (2020) Detailed analysis of paternal knockout Grb10 mice suggests effects on stability of social behavior, rather than social dominance. *Genes Brain Behav* 19(1): e12571.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12571>
73. *Müller K, Lengheimer T, Kral-Pointner JB, Wojta J, Yeghiazaryan L, Krall C, Palme R, Kleindorfer S, Plasenzotti R, Pollak DD, Tillmann KE* (2022) Exposure to soiled bedding reduces abnormal repetitive behaviors in mice. *Front Behav Neurosci* 2022: 16.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1062864>
74. *Garner JP, Dufour B, Gregg LE, Weisker SM, Mench JA* (2004) Social and husbandry factors affecting the prevalence and severity of barbering ('whisker trimming') by laboratory mice. *Appl Anim Behav Sci* 89(3): 263–282.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.07.004>
75. *Moody CM, Paterson EA, Leroux-Petersen D, Turner PV* (2021) Using paper nest pucks to prevent barbering in C57BL/6 Mice. *J Amer Assoc Lab Anim Sci* 60(2): 133–138.
<https://doi.org/10.30802/aalas-jaalas-20-000047>
76. *Chen SK, Tvrdik P, Peden E, Cho S, Wu S, Spangrude G, Capecchi MR* (2010) Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell* 141(5): 775–785.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.055>
77. *Koh HY, Kim D, Lee J, Lee S, Shin HS* (2008) Deficits in social behavior and sensorimotor gating in mice lacking phospholipase Cbeta1. *Genes Brain Behav* 7(1): 120–128.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00351.x>
78. *Kafkafi N, Agassi J, Chesler EJ, Crabbe JC, Crusio WE, Eilam D, Gerlai R, Golani I, Gomez-Marín A, Heller R, Iraqi F, Jaljuli I, Karp NA, Morgan H, Nicholson G, Pfaff DW, Richter SH, Stark PB, Stiedl O, Stodden V, Tarantino LM, Tucci V, Valdar W, Williams RW, Würbel H, Benjamini Y* (2018) Reproducibility and replicability of rodent phenotyping in preclinical studies. *Neurosci Biobehav Revs* 87: 218–232.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.01.003>
79. *Usui T, Macleod MR, McCann SK, Senior AM, Nakagawa S* (2021) Meta-analysis of variation suggests that embracing variability improves both replicability and generalizability in preclinical research. *PLoS Biol* 19(5): e3001009.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001009>
80. *Kahnau P, Jaap A, Hobbiesiefken U, Mieske P, Diederich K, Thöne-Reineke C, Lewejohann L, Hohlbaum K* (2022). A preliminary survey on the occurrence of barbering in laboratory mice in Germany. *Anim Welfare* 31(4): 433–436.
<https://doi.org/10.7120/09627286.31.4.009>
81. *Jaric I, Voelkl B, Amrein U, Wolfer DP, Novak J, Detotto C, Weber-Stadlbauer U, Meyer U, Manuela F, Mansuy IM, Würbel H* (2024) Using mice from different breeding sites fails to improve replicability of results from single-laboratory studies. *Lab Anim* 53(1): 18–22.
<https://doi.org/10.1038/s41684-023-01307-w>
82. *Segelcke D, Talbot SR, Palme R, La Porta C, Pogatzki-Zahn E, Bleich A, Tappe-Theodor A* (2023) Experimenter familiarization is a crucial prerequisite for assessing behavioral outcomes and reduces stress in mice not only under chronic pain conditions. *Sci Rep* 13(1): 2289.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-29052-7>
83. *Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, Sotocinal SG, Rosen S, Tuttle AH, Wieskopf JS, Acland EL, Dokova A, Kadoura B, Leger P, Mapplebeck JC, McPhail M, Delaney A, Wigerblad G, Schumann AP, Quinn T, Frasnelli J, Svensson CI, Sternberg WF, Mogil JS* (2014) Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods* 11(6): 629–632.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2935>

84. Mertens S, Vogt MA, Gass P, Palme R, Hiebl B, Chourbaji S (2019) Effect of three different forms of handling on the variation of aggression-associated parameters in individually and group-housed male C57BL/6NCrl mice. *PLoS One* 14(4): e0215367.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215367>
85. Liu H, Huang X, Xu J, Mao H, Li Y, Ren K, Ma G, Xue Q, Tao H, Wu S, Wang W (2021) Dissection of the relationship between anxiety and stereotyped self-grooming using the *Shank3B* mutant autistic model, acute stress model and chronic pain model. *Neurobiol Stress* 15: 100417.
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100417>
86. Zhukov IS, Karpova IV, Krotova NA, Tissen IY, Demin KA, Shabanov PD, Budygin EA, Kalueff AV, Gainetdinov RR (2022) Enhanced aggression, reduced self-grooming behavior and altered 5-HT regulation in the frontal cortex in mice lacking Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1). *Int J Mol Sci* 23(22): 14066.
<https://doi.org/10.3390/ijms232214066>
87. Krotova NA, Zhukov IS, Shabanov PD, Alenina N, Kalueff AV, Demin KA, Gainetdinov RR (2024). Alterations in self-grooming microstructure and exploration-related behavior in TPH2-KO rats. *Proc Neurosci Week 2024 Intl Conf* 30: 43.

Analyses of Rodent Grooming and its Behavioral Microstructure in Modern Neurobiological Studies

**K. V. Apukhtin^a, A. D. Shevlyakov^a, M. M. Kotova^a, S. V. Amikishiev^a, V. D. Riga^a,
A. D. Volgin^a, and A. V. Kalueff^{a, b, c, d, *}**

^a*Neurobiology Program, Scientific Center for Genetics and Life Sciences, Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Russia*

^b*Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia*

^c*Institute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

^d*World-class Scientific Center "Center for Personalized Medicine",
Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russian Federation,
St. Petersburg, Russia*

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

Grooming is a complex innate animal behavior used as an indicator of the physiological state of rodents under stress. Here, we analyze the impact of various experimental factors, including genetic, pharmacological and physiological, on self-grooming behavior of laboratory mice and rats. Analysis of grooming microstructure assesses not only the amount, but also the frequency, sequence, localization and consistency of this behavior, and can serve as a sensitive marker of changes in the brain, its response to stress, and predisposition to pathological conditions that model human mental illnesses, such as obsessive-compulsive disorder, autism and depression. Studying rodent self-grooming microstructure can provide valuable information about the mechanisms of brain pathogenesis and has multiple important translational implications for neuroscience research.

Keywords: grooming, rodents, grooming microstructure, central nervous system diseases

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ИССЛЕДОВАНИЕ Na^+/K^+ -АТФАЗЫ И КОМПОНЕНТОВ
 Ca^{2+} -ТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ В МИОКАРДЕ В УСЛОВИЯХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРЕДИАБЕТА И ДИАБЕТА
1-ГО ТИПА У КРЫС

© 2024 г. И. Б. Сухов^{1,*}, О. В. Чистякова¹, М. Г. Добрецов¹

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

* E-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Поступила в редакцию 23.10.2023 г.

После доработки 07.05.2024 г.

Принята к публикации 10.05.2024 г.

Одним из осложнений сахарного диабета (СД) является диабетическая кардиомиопатия, молекулярные механизмы патогенеза которой в полной мере не исследованы. Ранее показано участие Na^+/K^+ -АТФазы и компонентов Ca^{2+} -транспортирующей системы в кардиомиоцитах в развитии диабетической кардиомиопатии. Целью работы было изучить экспрессию и активность Na^+/K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы (SERCA2) в миокарде самцов крыс Вистар на модели индуцированного стрептозотоцином (STZ) преддиабета и явного СД 1-го типа (СД1). STZ вводили однократно в/б в дозе 30–35 мг/кг. Крыс с уровнем глюкозы выше 11 мМ считали диабетическими (STZ-D1 группа), с умеренной гипергликемией – преддиабетическими (STZ-preD1 группа). Определяли активность Na^+/K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы (по скорости высвобождения неорганического фосфата, P_i), методом RT-ПЦР оценивали экспрессию генов $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформ Na^+/K^+ -АТФазы, SERCA2 и Kir6.1, Kv7.1 и Kv2.1 калиевых каналов. В контрольной (С) группе активность чувствительной к 1 мМ убаина Mg^{2+} -зависимой АТФазы составляла 6.03 ± 0.6 ммоль P_i /г/ч. В группах STZ-D1 и STZ-preD1 активность Na^+/K^+ -АТФазы не отличалась от группы С. Уровень генной экспрессии $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы в группе STZ-D1 снижался более чем на 45%, тогда как в группе STZ-preD1 повышался на 64 и 81%, что может указывать на высокую чувствительностью экспрессии к инсулинопениии. Активность Ca^{2+} -АТФазы и экспрессия гена этого фермента в группах не различались – вероятно, 4-недельный период после введения STZ недостаточен для развития дефицита Ca^{2+} -АТФазы в сердце крысы. Уровень экспрессии генов подтипов калиевых каналов Kv2.1, Kir6.1 и Kv7.1 возрастал в STZ-preD1 группе, что может указывать на определенный вклад изученных подтипов калиевых каналов в адаптационный механизм к умеренной гипергликемии.

Ключевые слова: сахарный диабет, преддиабет, диабетическая кардиомиопатия, Na^+/K^+ -АТФаза, SERCA2, инсулин, крыса

DOI: 10.31857/S0869813924060033, EDN: BFBYKQ

ВВЕДЕНИЕ

Диабетическая кардиомиопатия (ДКМ) является одним из осложнений сахарного диабета (СД), ведущим к высокой смертности среди пациентов. Молекулярные механизмы патогенеза ДКМ в полной мере не исследованы. Ранее показано участие Na^+/K^+ -АТФазы и компонентов Ca^{2+} -транспортирующей системы в кардиомиоцитах в развитии ДКМ.

Na^+/K^+ -АТФаза – ионный транспортер, ответственный за поддержание высоких натриевого и калиевого градиентов на плазматической мембране эукариотических клеток. Для кардиомиоцитов как клеток с активным электрогенезом, функция Na^+/K^+ -АТФазы критически значима. В особенности это относится к контролю натриевого градиента, который определяет порог возбудимости клетки, скорость распространения и амплитуду потенциала действия, и активность множества вторичных транспортных систем, в первую очередь натрий-кальциевого обменника и глюкозных транспортеров – важных для регуляции внутриклеточного кальция и механизмов клеточной энергетики. В кардиомиоцитах сердца крысы экспрессируются две изоформы Na^+/K^+ -АТФазы: $\alpha 1$ – универсальная, присутствует во всех компартментах плазматической мембраны кардиомиоцитов; $\alpha 2$ – локализуется в t-трубочках, где количество мест этого транспортера контролируется инсулином [1, 2].

В процесс сопряжения возбуждения и сокращения кардиомиоцитов вовлечен комплекс белков, регулирующих уровень внутриклеточного Ca^{2+} . Саркоплазматическая Ca^{2+} -АТФаза (SERCA2), кодируемая специфичным для миокарда геном *Atp2a2*, выводит Ca^{2+} из цитозоля, способствуя расслаблению кардиомиоцитов. Инсулин регулирует SERCA2 в скелетных мышцах и в миокарде путем прямого контакта С-концевого домена SERCA2 с белками-субстратами инсулинового рецептора [3]. Снижение экспрессии или потеря функциональной активности данного транспортера может изменить Ca^{2+} -волны, что станет триггером для развития сердечной недостаточности. Кроме того, снижение активности SERCA2 понижает возврат Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум, что уменьшает уровень Ca^{2+} , доступного для следующего сердечного цикла сокращения-релаксации, и понижает сократительную способности миокарда [4]. Этот патогенный механизм лежит в основе развития ДКМ, которая на ранних стадиях проявляется диастолической дисфункцией сердца, а позже – систолической дисфункцией.

Известно, что реполяризация кардиомиоцитов определяется в значительной степени активностью калиевых каналов. Однако стоит отметить, что экспрессия каналов и вклад токов через них зависит от периода развития животного [5]. Ранее в наших исследованиях [6] у диабетических крыс было показано статистически значимое возрастание QT-интервала и значения QTc на 23 и 11% соответственно. Эти изменения имеют важное диагностическое значение для изучения диабетической кардиомиопатии и согласуются с данными литературы по исследованию ЭКГ у пациентов с СД 1-го типа (СД1) [7, 8]. У кроликов в условиях аллоксан-индуцированного СД1 также выявлено увеличение QT интервала [9]. Значимый вклад в изменение показателей ЭКГ, в частности, интервала QT, как при СД1, так при СД2, вносят каналы Kv 2.1 и Kv 7.1 [10, 11]. Локализация каналов Kv 2.1 в миоцитах желудочков взрослой крысы впервые описана в работе O'Connell с соавт. [12]. Показано, что все подтипы Kv7 каналов присутствуют в миоцитах крыс Wistar [13, 14]. Через 14 дней после индукции СД1 стрептозотоцином (STZ) у крыс в левых желудочках сердца содержание белков Kv2.1 и Kv4.2 и Kv4.3 и экспрессия мРНК соответствующих генов значительно снижаются [15]. Также показано, что после инфаркта миокарда у крыс снижена плотность белка Kv 2.1 и экспрессия мРНК соответствующего гена [16], а у крыс с сердечной недостаточностью, вызванной перевязкой проксимального отдела левой коронарной артерии, экспрессия каналов Kv 2.1 и Kv 7.1 возрастает в синоатриальном узле [17]. Таким образом, имеющиеся данные неоднозначны относительно вклада токов Iss в развитие в сердечной недостаточности и ДКМ.

Ранее, исследуя роль K⁺-каналов в патогенезе сердечных нарушений в условиях СД [18], мы пришли к заключению, что в кардиомиоцитах крыс через две недели после введения STZ фаза следовой гиперполяризации, отчетливо выраженная в большинстве потенциалов действия, обусловлена возрастанием активности АТФ-зависимых K⁺-каналов (Kir6.x). Другими авторами в миоцитах крыс показана стимулируемая сахарозой экспрессия гена канала Kir6.1 [19].

Суммируя вышеизложенное, можно утверждать, что дефицит инсулина при СД1 ослабляет сигнальные каскады гормона в мышцах, в том числе в миокарде [20, 21]. Обращает внимание тот факт, что, как показано нами ранее [22], для нормализации действия инсулина в мышцах недостаточно устранения дефицита гормона путем инсулинотерапии, и, очевидно, что молекулярные инсулин-зависимые сигнальные каскады в мышцах претерпевают более глубокие молекулярные перестройки, которые недостаточно изучены на данный момент. Целью исследования было изучение экспрессии и активности Na⁺/K⁺-АТФазы компонентов Ca²⁺-транспортирующей системы (SERCA2) и калиевых каналов в миокарде самцов крыс на модели индуцированного стрептозотоцином преддиабета и явного СД1.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. Исследования проводили на самцах крыс Вистар массой тела 240–260 г на начало эксперимента. Развитие СД индуцировали однократным в/б введением стрептозотоцина (STZ, Sigma, США) в дозе 30–35 мг/кг. Животным контрольной группы (С, *n* = 13) вводили цитратный буфер (рН 4.6) в эквивалентном объеме. Крыс с уровнем глюкозы выше 11 мМ считали диабетическими (STZ-D1 группа, *n* = 16), с умеренной гипергликемией (7.8–11 мМ) – преддиабетическими (preSTZ-D1 группа, *n* = 9), в соответствии с принятыми клиническими критериями преддиабета, удовлетворяющими экспериментальную модель [23]. Количество животных преддиабетических и диабетических при дозе STZ 30 мг/мл составляло 40 и 60%, при дозе 35 мг/кг – 30 и 70% соответственно. Уровень глюкозы измеряли с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания). Забор левых желудочков (ЛЖ) сердца проводили через 4 недели после инъекции STZ. Животных выводили из эксперимента декапитацией после анестезии хлоралгидратом (в/б, в дозе 400 мг/кг). Ткань хранили при –80 °С до определения активности ферментов и уровня экспрессии генов.

Анализ уровня экспрессии генов. Анализ уровня экспрессии генов проводили методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, совмещенной с обратной транскрипцией. Тотальную РНК из миокарда левых желудочков выделяли с помощью коммерческого набора «Reagent ExtractRNA» (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя с использованием стеклянных гомогенизаторов. Образцы РНК тестировали в 2%-ном агарозном геле для контроля отсутствия деградации препаратов РНК.

Для обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) брали 1 мг РНК и использовали набор MMLV RT (Евроген, Россия). ОТ-ПЦР проводили с использованием Random Hexamer Primer в соответствии с протоколом производителя. Предварительно все образцы РНК обрабатывали DNaseI, RNase-free (Thermo Fisher Scientific Inc., США) для очистки от содержащих примесей молекул ДНК.

ПЦР амплификацию проводили с идентификаций SybrGreen в объеме 25 мкл следующего состава: 10 нг продукта ОТ-ПЦР, 0.4 мкМ прямого и обратного праймера, реагент qPCRmix-HSSYBR+LowROX (Евроген, Россия). Непосредственно ПЦР проводили с помощью прибора 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies (ABI), Thermo Fisher Scientific Inc., США). Режим амплификации: (1) 95 °С в течение 5 мин; (2) трех-этапная амплификация и детекция – 38 циклов при 95 °С в течение 30 с, (температура

отжига подбирались индивидуально) в течение 30 с, и 72 °С в течение 30 с; (3) кривая плавления (для детекции диммеров). Температура отжига праймеров была рассчитана с помощью программы Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Размер ампликона ПЦР реакции протестировали в 2%-ном агарозном геле. Праймеры для анализа уровня экспрессии генов приведены в табл. 1.

Анализ результатов ПЦР проводился по методу $\Delta\Delta C_t$. В качестве гена «домашнего хозяйства» использована 18S/45S рибосомальная РНК.

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидов

Мишень исследования	Ген	Последовательность прямого и обратного праймеров	Источник
Na ⁺ /K ⁺ транспортирующая субъединица $\alpha 1$	<i>Atp1a1</i>	CCCAAAACGGACAAACT GCACTACCACGATACTGAC	24
Na ⁺ /K ⁺ транспортирующая субъединица $\alpha 2$	<i>Atp1a2</i>	GGTGGCCCTCCGAATGTAC ATGAAGATGAGGAGACTGTAGGGAAA	25
18S/45S ribosomal RNA	<i>Rn18s/ Rn45s</i>	GTAACCCGTTGAACCCCATC CCATCCAATCGGTAGTAGCG	26
Kv2.1	<i>Kcnb1</i>	GACGACTACAGCCTTGAGGAC TCGTTTCATCTGCTCCTTCTTT	27
Kir6.1	<i>Kcnj8</i>	AGCTGGCTGCTCTTCGCTATC CCCTCCAAACCCAATGGTCACT	28
Kv7.1	<i>Kcnq1</i>	ACCTCATCGTGGTTGTAGCC TCCTGGCGGTGAATGAAGAC	29
SERCA2	<i>Atp2a2</i>	AAACCCCCACGGAACCCAAAAG AAGTCTGGGTTGTCTCCTTACACT	30

Анализ активности Na^+/K^+ -АТФазы. У животных групп С ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 3$) и STZ-D1 ($n = 8$) активность Na^+/K^+ -АТФазы определяли в микросомальной фракции мембран миокарда, выделенной из левого желудочка сердца методом дифференциального центрифугирования [31] по содержанию неорганического фосфата P_i (P_i ммоль/г/ч) в инкубационной среде (мМ): 20 Трис- HCl (рН 7.4), 150 NaCl , 10 KCl , 3 АТФ, 3 MgCl_2 , 1 ЭГТА, 1 $\text{Na}_2\text{АТФ}$ (метод Фиске-Суббароу). После 10-минутной инкубации при 37°C реакцию останавливали добавлением 10%-ной ТХУ. Активность Na^+/K^+ -АТФазы рассчитывали, вычитая из общей АТФазной активности Mg^{2+} -зависимую, определяемую в присутствии 1 мМ или 100 мкМ убаина – селективного ингибитора Na^+/K^+ -АТФазы, полностью блокирующего активность $\alpha 1$ и $\alpha 2$, $\alpha 3$ -изоформы крысиного фермента при указанных концентрациях [32].

Анализ активности Ca^{2+} -АТФазы (SERCA2). У животных групп С ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 3$) и STZ-D1 ($n = 8$) активность SERCA2 определяли в препаратах легкой фракции саркоплазматического ретикула миокарда, выделенной методом дифференциального центрифугирования, по содержанию неорганического фосфата P_i (P_i ммоль/г/ч) в инкубационной среде (мМ): 100 KCl , 5 MgCl_2 , 0.5 ЭДТА, 30 имидозол, 3 АТФ и ~ 10 свободного Ca^{2+} (метод Фиске-Суббароу). Активность SERCA2 рассчитывали, как разность между общей АТФазной активностью и активностью Mg^{2+} -АТФазы, определяемой в бескальциевой инкубационной среде с добавлением 100 нМ тапсигаргина – специфического ингибитора SERCA2 [33–35].

Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали, используя пакет программ GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Для контроля соответствия нормальному распределению использовали критерий Шапиро-Уилка. При подтверждении нормальности распределения полученных данных описательная статистика включала среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (SEM), при ненормальности – значения медианы и процентилей. Параметрический критерий применяли: для сравнения двух несвязанных совокупностей – t -тест, для сравнения трех и более несвязанных совокупностей – метод ANOVA с поправкой Тьюки. Непараметрические критерии применяли: для двух независимых выборок – критерий Манна-Уитни, для более двух несвязанных совокупностей – критерий Крускала-Уоллиса и последующий тест Дана, для трех и более связанных совокупностей – тест Фридмана и последующий тест Дана.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика модели

До индукции патологии масса тела животных в группах и уровень случайной глюкозы не различались (табл. 2). У контрольной С группы масса тела статистически значимо увеличивалась, начиная с 14-го дня эксперимента, уровень глюкозы в группе на протяжении всего эксперимента не менялся. У STZ-preD1 группы масса тела в ходе эксперимента не менялась, а уровень глюкозы на 3-й и 14-й дни после введения STZ был статистически значимо выше такового у группы С. У STZ-D1 группы на 3-й и 14-й дни после введения STZ масса тела была меньше, чем до введения STZ, а также меньше, чем у контрольных животных. Уровень глюкозы у STZ-D1 группы через 3 дня после введения STZ и далее до конца эксперимента был статистически значимо выше такового в контрольной С группе. Масса сердца в конце эксперимента у животных контрольной С и STZ-preD1 групп не различалась. У животных STZ-D1 группы масса сердца была статистически значимо меньше, чем у контрольных животных (табл. 2).

Таблица 2. Уровень случайной глюкозы, масса тела и сердца у экспериментальных животных

День эксперимента	Контрольная (С) группа, <i>n</i> = 13	STZ-preD1 группа, <i>n</i> = 9	STZ-D1 группа, <i>n</i> = 16
Глюкоза, мМ			
День введения STZ	5.8 (5.4; 6.5)	5.9 (5.5; 6.1)	5.9 (5.7; 6.3)
3 дня после введения STZ	6.3 (5.6; 6.6)	9.2 (8.9; 13.6)* # * <i>p</i> < 0.0001 # <i>p</i> = 0.0448	25.8 (23.6; 27.5)* # * <i>p</i> = 0.0007 # <i>p</i> < 0.0001
14 дней после введения STZ	5.8 (5.1; 6.3)	7.5 (7.3; 8.7)	27.4 (22.0; 32.0)* # * <i>p</i> = 0.0003 # <i>p</i> < 0.0001
28 дней после введения STZ	6.0 (5.7; 6.1)	7.8 (7.6; 8.7)* # * <i>p</i> = 0.0057 # <i>p</i> = 0.0445	30.8 (28.2; 33.0)* # * <i>p</i> < 0.0001 # <i>p</i> < 0.0001
Масса тела, г			
День введения STZ	364 (318; 391)	374 (332; 394)	353 (345; 370)
3 дня после введения STZ	376 (322; 400)	356 (321; 384)	331 (323; 368)
14 дней после введения STZ	380 (334; 407)* <i>p</i> = 0.0004	371 (338; 392)	319 (299; 326)* # * <i>p</i> < 0.0001 # <i>p</i> = 0.0012
28 дней после введения STZ	390 (344; 419)* <i>p</i> < 0.0001	383 (342; 399)	305 (289; 330)* # * <i>p</i> < 0.0001 # <i>p</i> = 0.0003
Масса сердца, г			
28 дней после введения STZ	0.98 (0.88; 1.03)	1.02 (1.00; 1.12)	0.88 (0.83; 0.96)* <i>p</i> = 0.0359

Данные представлены как медиана (25-й; 75-й процентиля).

* – статистически значимое отличие от значения в группе в день введения STZ, тест Фридмана и последующий тест Дана. # – статистически значимое отличие от значения в контрольной группе в соответствующий день эксперимента, тест Крускала-Уоллиса и последующий тест Дана.

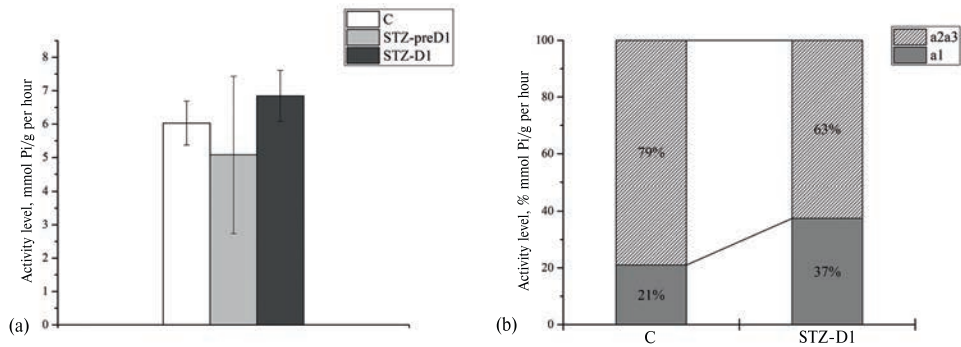


Рис. 1. Уровень активности Na⁺/K⁺-АТФазы в левом желудочке в группах контрольной (C, $n = 5$), STZ-preD1 ($n = 3$) и STZ-D1 ($n = 8$). (a) – активность чувствительной к убаину (1 mM) Mg²⁺-зависимой Na⁺/K⁺-АТФазы. Данные представлены как $M \pm SEM$. (b) – активность высокочувствительной к убаину (100 nM) Na⁺/K⁺-АТФазы. Данные представлены как % от общей активности Na⁺/K⁺-АТФазы.

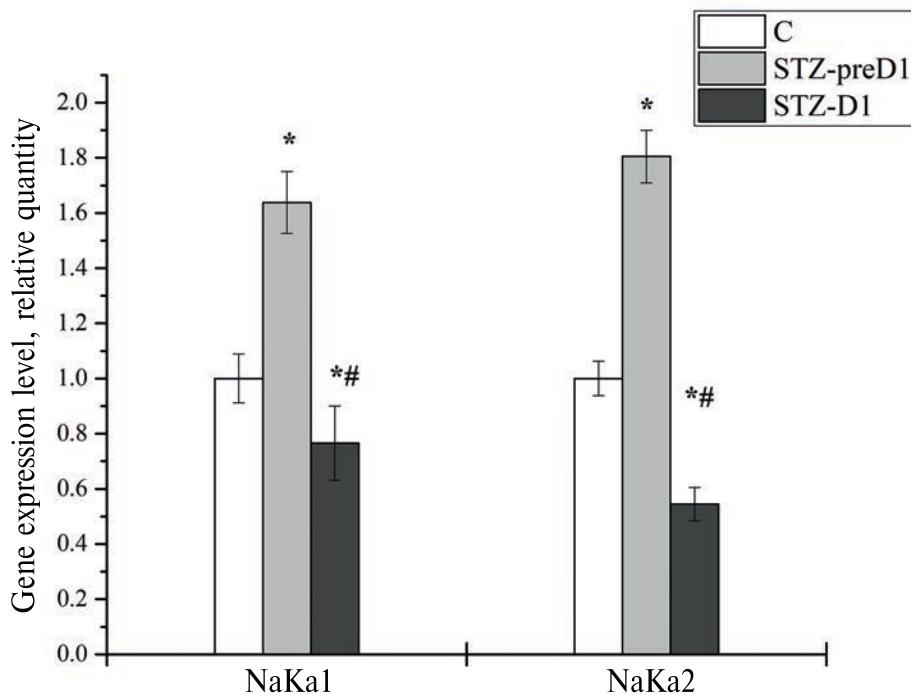


Рис. 2. Уровень экспрессии генов субъединиц $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы Na⁺/K⁺-АТФазы в левом желудочке в группах C ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 8$) и STZ-D1 ($n = 8$) группах. Данные представлены как $M \pm SEM$. Статистически значимые отличия, при $p < 0.05$: * – групп STZ-preD1 и STZ-D1 от группы C; # – группы STZ-D1 от STZ-preD1. Референсный ген – 18S/45S рибосомальная РНК.

Исследование Na^+/K^+ -АТФазы

Активность Na^+/K^+ -АТФазы в левом желудочке в группах STZ-preD1 и STZ-D1 не отличалась от таковой в группе С, составляя 84 и 113% соответственно от контрольного уровня (рис. 1а).

Фракция высокочувствительной к убаину (100 нМ) активности Na^+/K^+ -АТФазы ($\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -изоформы) в группах С и STZ-D1 составляла 79 и 63% от общей активности Na^+/K^+ -АТФаза (рис. 1б).

Уровень экспрессии генов *Atp1a1* и *Atp1a2*, кодирующих $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы Na^+/K^+ -АТФазы, возрастал в группе STZ-preD1 на 63.8 и 80.5% относительно группы С, и снижался в группе STZ-D1 на 23.4 и 45.5% (рис. 2).

Исследование SERCA2

В группах С, STZ-preD1 и STZ-D1 уровень активности SERCA2, а также уровень экспрессии соответствующего гена *Atp2a2* не различались (рис. 3а, б).

Исследование уровня экспрессии генов подтипов калиевых каналов *Kv2.1*, *Kir6.1* и *Kv7.1*

ПЦР анализ показал, что в группе STZ-preD1 по сравнению с группой С экспрессия транскриптов *Kv2.1*, *Kir6.1* и *Kv7.1* подтипов калиевых каналов возрастала на 85, 99 и 92% соответственно (рис. 4). В группе STZ-D1 транскрипции РНК изученных подтипов калиевых каналов не отличалась от таковой в группе С.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные литературы относительно уровня активности Na^+/K^+ -АТФазы в модельных экспериментах СД1 достаточно противоречивы [1, 36–38], но в ряде работ уже через две недели после введения STZ показано значительное – до 35–40%, снижение максимальной активности Na^+/K^+ -АТФазы [39]. В этой связи при анализе данных по активности Na^+/K^+ -АТФазы, вероятно, необходимо учитывать возраст животных при индукции патологии, сроки развития СД1, а также малоконтролируемые биохимические сдвиги уровней глюкозы и инсулина в крови экспериментальных животных.

Уровень фракций высокочувствительной к убаину Na^+/K^+ -АТФаза ($\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -изоформы) в группах С и STZ-D1, обнаруженный нами в данном исследовании, превышает пределы этой фракции, описанные в работах [1, 32, 35, 39], но, тем не менее, соответствует литературным данным [1, 36, 39], где описано, что при развитии СД1 пропорции $\alpha 1/\alpha 2$ изоформ существенно не меняются. В одной работе описано, что при 6-недельном STZ-D1 снижается количество высокоаффинных к убаину связывающих мест ($\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -изоформы), но не низкоаффинных ($\alpha 1$ -изоформа) [37].

Ранее при анализе профилей мРНК, кодирующих белки, связанные с генерацией и проведением электрической активности в биоптатах атриовентрикулярного узла (АВ-узел), в сердцах диабетических крыс через 12 недель после введения STZ в дозе 60 мг/кг заметных различий в экспрессии генов *Atp1a1* и *Atp1a2*, кодирующих $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы Na^+/K^+ -АТФазы, не было выявлено [40]. Нами ранее показано [41], что в миокарде левого желудочка у крыс с преддиабетом активность Na^+/K^+ -АТФазы не отличалась относительно таковой у контрольных животных, но снижалась у животных с 4-недельным СД1. Выявленное в настоящем исследовании снижение экспрессии генов *Atp1a1* и *Atp1a2* в группе STZ-D1 на фоне стабильной активности Na^+/K^+ -АТФазы, можно рассматривать как фактор, обуславливающий снижение активности Na^+/K^+ -АТФаза по мере усугубления диабетических нарушений.

При имеющимся достаточном количестве работ, показывающих, что ухудшение сердечной деятельности при диабете сопряжено с уменьшением содержания белка SERCA2 и снижением поглощения кальция в саркоплазматическом ретикуле

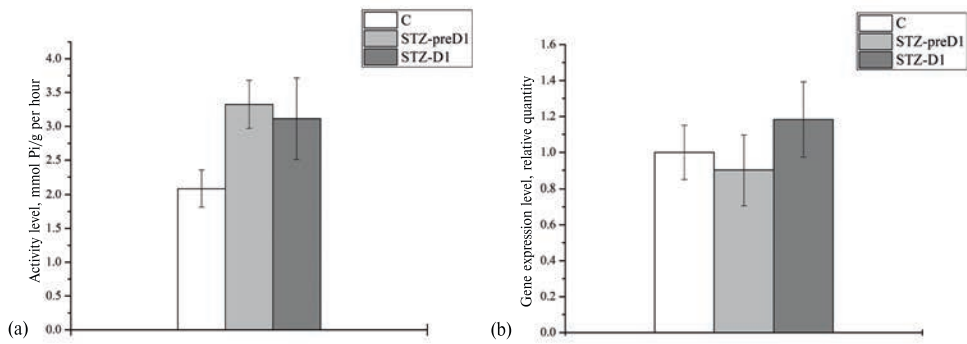


Рис. 3. Уровень активности (а) и экспрессии гена фермента SERCA2 (б) в левом желудочке (а) группы С ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 3$) и STZ-D1 ($n = 8$), (б) группы С ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 8$) и STZ-D1 ($n = 8$). Данные представлены как $M \pm SEM$. Референсный ген для ПЦР – 18S/45S рибосомальная РНК.

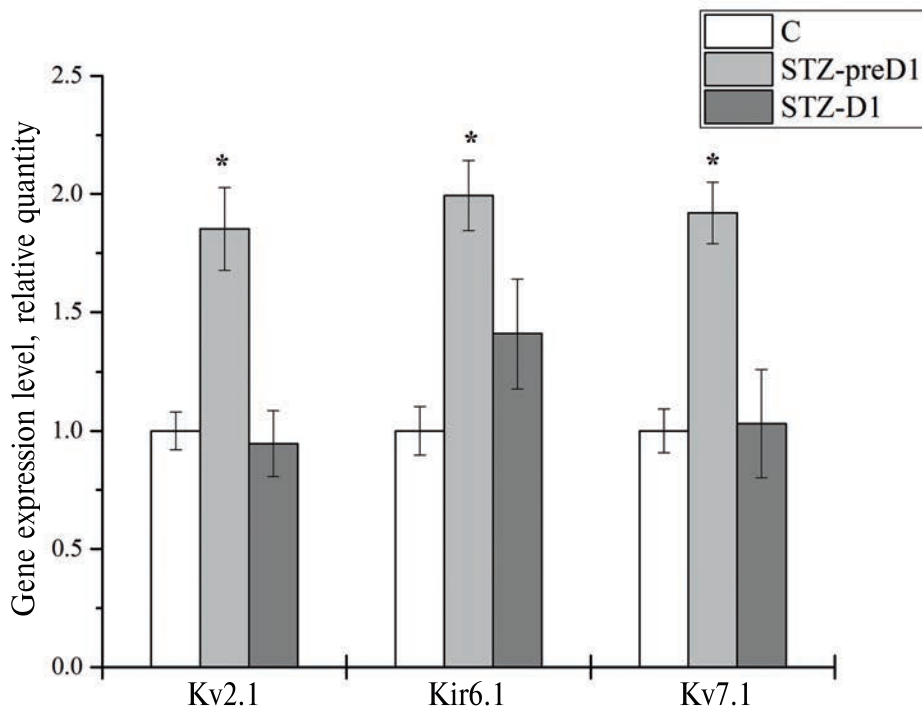


Рис. 4. Уровень экспрессии генов подтипов калиевых каналов Kv2.1, Kir6.1 и Kv7.1 в левом желудочке в группах С ($n = 5$), STZ-preD1 ($n = 8$) и STZ-D1 ($n = 8$). Данные представлены как $M \pm SEM$. Статистически значимые отличия при $p < 0.05$: * – группа STZ-preD1 от С. Референсный ген – 18S/45S рибосомальная РНК.

кардиомиоцитов [42, 43], однако механизмы, лежащие в основе патологии, до конца не установлены. Основным регулятором SERCA2 сердца является интегральный белок мембран фосфоламбан (PLB), ингибирующее действие которого заключается в уменьшении активности Ca^{2+} -АТФазы и снижении ее сродства к кальцию за счет изменения характера белок-белковых взаимодействий при изменении конформации как фосфоламбана, так и Ca^{2+} -АТФазы [44]. PLB, фосфорилируемый цАМФ-зависимой протеинкиназой (PKA), теряет способность ингибировать SERCA2. Предыдущие исследования выявили значительное повышение экспрессии PLB на уровнях мРНК и белка у крыс с STZ-СД1 по сравнению с контрольными животными, при снижении активности и экспрессии SERCA-2. Так, в сердце крыс линии Спрэг-Доули через 10 недель после однократного введения STZ в дозе 70 мг/кг значительно возрастала экспрессия PLB и протеинкиназы C (PKC), но снижалась экспрессия SERCA2, протеинфосфатазы-1 (PPI-1) и риадинового рецептора (RyR), что позволило предполагать важную роль в патогенезе ДКМ сигнального пути PKC/PPI-1/PLB/SERCA2 [45].

В другой работе у крыс Спрэг-Доули через 6 недель после однократного введения STZ в дозе 65 мг/кг ухудшение сердечной деятельности и снижение поглощения кальция саркоплазматическим ретикуломом (SR) сердца сопровождалось снижением уровней белков SERCA2 и PLB, однако соотношение PLB и SERCA2 в сердце было повышено [46]. Отмеченное снижение фосфорилирования PLB Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназой (CaMK) и PKA, при том, что их активности были повышены, объясняется снижением содержания белка PLB, а также повышенной активностью SR-ассоциированной протеинфосфатазы. Авторы заключают, что в диабетическом сердце в ответ на депрессию функции SR активируется процесс фосфорилирования, однако этот компенсаторный механизм может быть недостаточен для поддержания функции SR из-за значительного снижения белка SERCA2, а также значительного увеличения дефосфорилирования PLB.

В настоящем исследовании через 4 недели после введения STZ нарушения функции SR в миокарде крыс, вероятно, не имеют драматичный характер и достаточно скомпенсированы, что отражается в стабильности экспрессии гена *Atp2a2* и выраженной активности SERCA2. Ранее в биоптатах АВ-узла сердец крыс через 12 недель после введения STZ различий в экспрессии гена *Atp2a2* также не было выявлено [40].

Возможной причиной нарушения биоэлектрической активности в миокарде может являться изменение соотношения потенциал-зависимых ионных каналов и транспортеров, как описано нами ранее [18]. Одним из факторов, влияющих на данное соотношение, является уровень экспрессии генов ионных каналов или транспортеров. По нашим данным при умеренной гипергликемии в группе STZ-preD1 экспрессия генов подтипов калиевых каналов Kv2.1, Kir6.1 и Kv7.1 увеличивается в 1.8–2 раза относительно контроля. Однако эта активация транскрипции, по-видимому, не сопровождается увеличением трансляции и экспрессии протеинов и доставкой соответствующих калиевых каналов на плазматическую мембрану кардиомиоцитов. В противном случае можно было бы ожидать укорочение, а не удлинение потенциалов действия, регистрируемых в кардиомиоцитах преддиабетических крыс через 4 недели после введения STZ, как показано ранее [18]. Согласно выше цитируемой работе [40], у крыс при СД1 в сердце, в клетках АВ-узла экспрессия генов *Kcnb1* (Kv2.1 канал), *Kcnj8* (Kir6.1 канал) и *Kcnq1* (Kv7.1 канал) не менялась. При обсуждении роли KCNQ (Kv7) каналов в развитии сердечно-сосудистых факторов риска, таких как гипертония, СД и ожирение [47] важно, что работа Kv7.1 каналов и характеристика тока через данный тип каналов могут модулироваться аксессуарной субъединицей MinK, однако ее роль в потенцировании нарушений физиологической функции миокарда до конца не ясна. Так, у собак в условиях аллоксанового СД1 в желудочках миокарда показано

увеличение уровня белка Kv7.1. при снижении MinK [48]. Однако у кролика в условиях аллоксанового СД1 при постоянстве активности Kv7.1 выявлено снижение количества белка MinK [9].

Таким образом, интегральная оценка активности ионных каналов, их насосной функции, а также экспрессии соответствующих генов требует учитывать региональную и/или клеточную специфику и ряд коэкспрессируемых вспомогательных факторов. В этой связи для понимания внутриклеточных процессов, протекающих в миокарде в условиях преддиабета и выраженного СД1, перспективным видится использование клеточных культур и переживающих срезов.

На основании полученных результатов сделаны выводы:

1. У крыс в миокарде левого желудочка при предСД1 и СД1 активность Na⁺/K⁺-АТФазы сохраняется стабильной относительно контрольного уровня. При этом уровень экспрессии генов *Atp1a1* и *Atp1a2*, кодирующих $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -изоформы Na⁺/K⁺-АТФазы, возрастает при предСД1, но снижается при СД1 относительно контрольного уровня. Это может указывать на высокую чувствительностью данного транспортёра к инсулинопениии.
2. Активность Ca²⁺-АТФазы и экспрессия гена *Atp2a2* у крыс в миокарде левого желудочка при предСД1 и СД1 стабильны, что может отражать ключевую роль данной АТФазы для сократительной функции кардиомиоцита.
3. Уровень экспрессии генов подтипов калиевых каналов Kv2.1, Kir6.1 и Kv7.1 в миокарде левого желудочка крыс возрастает при предСД1, но при СД1 не отличается от контрольного уровня, что может указывать на определенный вклад изученных подтипов калиевых каналов в адаптационный механизм к умеренной гипергликемии.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания № 075–00264–24–00 Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН. 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 № 2–1/2022 от 24.02.2022 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosta K, Tulassay E, Enzsoly A, Ronai K, Szantho A, Pandics T, Fekete A, Mandl P, Ver A (2009) Insulin induced translocation of Na⁺/K⁺-ATPase is decreased in the heart of streptozotocin diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin* 30: 1616–1624.
<https://doi.org/10.1038/aps.2009.162>
2. Despa S (2018) Myocyte [Na⁺]_i dysregulation in heart failure and diabetic cardiomyopathy. *Front Physiol* 9: 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01303>
3. Algenstaedt P, Antonetti DA, Yaffe MB, Kahn CR (1997) Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca²⁺-ATPases in muscle and heart. *J Biol Chem* 272: 23696–23702.
<https://doi.org/10.1074/JBC.272.38.23696>
4. Zarain-Herzberg A, Garcia-Rivas G, Estrada-Avilés R (2014) Regulation of SERCA pumps expression in diabetes. *Cell Calcium* 56: 302–310.
<https://doi.org/10.1016/J.CECA.2014.09.005>
5. Grandy SA, Trépanier-Boulay V, Fiset C (2007) Postnatal development has a marked effect on ventricular repolarization in mice. *Am J Physiol – Hear Circ Physiol* 293: 2168–2177.
<https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00521.2007>
6. Сухов ИБ, Чистякова ОВ, Баюнова ЛВ, Шестакова НН (2023) Оценка побочных эффектов применения ингибитора Na-Ca обменника KB-R7943 как противоболевого препарата при диабетической нейропатии у крыс. *Интегра́т физиол* 4: 69–78. [Sukhov IB, Chistyakova OV, Bayunova LV, Shestakova NN (2023) Evaluation of side effects of na-ca exchange inhibitor kb-r7943 used as an analgesic drug in diabetic neuropathy in rats. *Integrat fiziol* 4: 69–78. (In Russ)].
<https://doi.org/10.33910/2687-1270-2023-4-1-69-78>
7. Amione C, Giunti S, Fornengo P, Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Fuller JH, Barutta F, Gruden G, Bruno G (2017) Incidence of prolonged QTc and severe hypoglycemia in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Acta Diabetol* 54: 871–876.
<https://doi.org/10.1007/S00592-017-1018-6/TABLES/2>
8. Inanir M, Gunes Y, Sincer I, Erdal E (2020) Evaluation of electrocardiographic ventricular depolarization and repolarization variables in type 1 diabetes mellitus. *Arq Bras Cardiol* 114: 275–280.
<https://doi.org/10.36660/ABC.20180343>
9. Zhang Y, Xiao J, Lin H, Luo X, Wang H, Bai Y, Wang J, Zhang H, Yang B, Wang Z (2007) Ionic mechanisms underlying abnormal qt prolongation and the associated arrhythmias in diabetic rabbits: a role of rapid delayed rectifier K⁺ current. *Cell Physiol Biochem* 19: 225–238.
<https://doi.org/10.1159/000100642>
10. Gallego M, Zayas-Arrabal J, Alquiza A, Apellaniz B, Casis O (2021) Electrical features of the diabetic myocardium. arrhythmic and cardiovascular safety considerations in diabetes. *Front Pharmacol* 12: 687256.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.687256>
11. Ozturk N, Uslu S, Ozdemir S (2021) Diabetes-induced changes in cardiac voltage-gated ion channels. *World J Diabet* 12: 1–18.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i1.1>
12. O'Connell KM, Whitesell JD, Tamkun MM (2008) Localization and mobility of the delayed-rectifier K⁺ channel Kv2.1 in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(1): H229–H237.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01038.2007>
13. Hedegaard ER, Johnsen J, Povlsen JA, Jespersen NR, Shanmuganathan JA, Laursen MR, Kristiansen SB, Simonsen U, Botker HE (2016) Inhibition of KV7 Channels Protects the Rat Heart against Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *J Pharmacol Exp Ther* 357(1): 94–102.
<https://doi.org/10.1124/jpet.115.230409>
14. Morales-Cano D, Moreno L, Barreira B, Pandolfi R, Chamorro V, Jimenez R, Villamor E, Duarte J, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A (2015) Kv7 channels critically determine coronary artery reactivity: left-right differences and down-regulation by hyperglycaemia. *Cardiovasc Res* 106(1): 98–108.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvv020>
15. Qin D, Huang B, Deng L, El-Adawi H, Ganguly K, Sowers JR, El-Sherif N (2001) Downregulation of K⁽⁺⁾ channel genes expression in type I diabetic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 549–553.
<https://doi.org/10.1006/BBRC.2001.4825>
16. Huang B, Qin D, El-Sherif N (2001) Spatial alterations of Kv channels expression and K⁽⁺⁾ currents in post-MI remodeled rat heart. *Cardiovasc Res* 52(2): 246–254.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00378-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00378-9)

17. Yanni J, Tellez JO, Maczewski M, Mackiewicz U, Beresewicz A, Billeter R, Dobrzynski H, Boyett MR (2011) Changes in ion channel gene expression underlying heart failure-induced sinoatrial node dysfunction. *Circ Heart Fail* 4(4): 496–508.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.957647>
18. Кубасов ИВ, Степанов АВ, Панов АА, Чистякова ОВ, Сухов ИБ, Добрецов МГ (2021) Роль калиевых токов в формировании фазы следовой гиперполяризации внеклеточных потенциалов действия вентрикулярных кардиомиоцитов крысы в норме и при стрептозотоциновом сахарном диабете. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 107: 1583–1596. [Kubasov IV, Stepanov AV, Panov AA, Chistyakova OV, Sukhov IB, Dobretsov MG (2021) Role of potassium currents in the formation of after-hyperpolarization phase of extracellular action potentials recorded from the control and diabetic rat heart ventricular myocytes. *Russ J Physiol* 107: 1583–1596. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813921120062>
19. Gaber EM, Jayaprakash P, Qureshi MA, Parekh K, Oz M, Adrian TE, Howarth FC (2014) Effects of a sucrose-enriched diet on the pattern of gene expression, contraction and Ca⁽²⁺⁾ transport in Goto-Kakizaki type 2 diabetic rat heart. *Exp Physiol* 99(6): 881–893.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.077594>
20. Mandavia CH, Aroor AR, Demarco VG, Sowers JR (2013) Molecular and metabolic mechanisms of cardiac dysfunction in diabetes. *Life Sci* 92: 601–608.
<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2012.10.028>
21. Sukhov IB, Chistyakova OV (2022) Impact of intranasal insulin administration on Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺-transporting system components in rat cardiomyocytes with type 1 diabetes mellitus. *J Biomed* 18: 52–62.
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-52-62>
22. Kubasov IV, Arutyunyan RS, Dobretsov MG, Shpakov AO, Matrosova EV (2014) Effect of insulin on characteristics of contractile responses of fast and slow skeletal muscles of rats with acute streptozotocin-induced diabetes. *J Evol Biochem Physiol* 50: 136–145.
<https://doi.org/10.1134/S0022093014020069/METRICS>
23. Dobretsov M, Backonja MM, Romanovsky D, Stimers JR (2011) Animal models of diabetic neuropathic pain. *Neuromethods* 49: 147–169.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-880-5_9/TABLES/3
24. Mendez N, Torres-Farfan C, Salazar E, Bascur P, Bastidas C, Vergara K, Spichiger C, Halabi D, Vio CP, Richter HG (2019) Fetal programming of renal dysfunction and high blood pressure by chronodisruption. *Front Endocrinol* 10: 362.
<https://doi.org/10.3389/FENDO.2019.00362>
25. Galuska D, Kotova O, Barrès R, Chibalina D, Benziane B, Chibalin AV (2009) Altered expression and insulin-induced trafficking of Na⁺-K⁺-ATPase in rat skeletal muscle: effects of high-fat diet and exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(1): E38–E49.
<https://doi.org/10.1152/AJPENDO.90990.2008>
26. Yu Z, Liu J, Van Veldhoven JPD, Ijzerman AP, Schalij MJ, Pijnappels DA, Heitman LH, De Vries AAF (2016) Allosteric modulation of Kv11.1 (hERG) channels protects against drug-induced ventricular arrhythmias. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 9(4): e003439.
<https://doi.org/10.1161/CIRCEP.115.003439>
27. Alessandri-Haber N, Alcaraz G, Deleuze C, Jullien F, Manrique C, Couraud F, Crest M, Giraud P (2002) Molecular determinants of emerging excitability in rat embryonic motoneurons. *J Physiol* 541: 25–39.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2001.013371>
28. Liu X, Duan P, Hu X, Li R, Zhu Q (2016) Altered KATP channel subunits expression and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats with age. *J Cardiovasc Pharmacol* 68: 143–149.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000394>
29. Zimmer J, Takahashi T, Hofmann AD, Puri P (2017) Downregulation of KCNQ5 expression in the rat pulmonary vasculature of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 52: 702–705.
<https://doi.org/10.1016/J.JPDSURG.2017.01.016>
30. Hu W, Xu T, Wu P, Pan D, Chen J, Chen J, Zhang B, Zhu H, Li D (2017) Luteolin improves cardiac dysfunction in heart failure rats by regulating sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2a. *Sci Rep* 7: 41017.
<https://doi.org/10.1038/SREP41017>
31. Bublitz M (ed) (2016) P-Type ATPases. Springer. Humana New York. NY.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3179-8>
32. Lucchesi PA, Sweadner KJ (1991) Postnatal changes in Na, K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle: conservation of biphasic ouabain affinity. *J Biol Chem* 266: 9327–9331.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)31589-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)31589-8)
33. Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 266: 17067–17071.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)47340-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)47340-7)

34. *Saborido A, Delgado J, Megías A* (1999) Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity and E-type Mg^{2+} -ATPase activity in rat heart homogenates. *Anal Biochem* 268: 79–88. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.3043>
35. *Andersen TB, López CQ, Manczak T, Martinez K, Simonsen HT* (2015) Thapsigargin – from Thapsia L. to mipsagargin. *Molecules* 20: 6113–6127. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES20046113>
36. *Gerbi A, Barbey O, Raccach D, Coste T, Jamme I, Nouvelot A, Ouafik L, Lévy S, Vague P, Maixent JM* (1997) Alteration of Na, K-ATPase isoenzymes in diabetic cardiomyopathy: effect of dietary supplementation with fish oil (n-3 fatty acids) in rats. *Diabetologia* 40: 496–505. <https://doi.org/10.1007/S001250050707>
37. *Kato K, Lukas A, Chapman DC, Rupp H, Dhalla NS* (2002) Differential effects of etomoxir treatment on cardiac Na^{+} - K^{+} ATPase subunits in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 232: 57–62. <https://doi.org/10.1023/A:1014841216418>
38. *Vlkovičová J, Javorková V, Štefek M, Kyseľová Z, Gajdošíková A, Vrbjar N* (2006) Effect of the pyridoinole antioxidant stobadine on the cardiac Na^{+} , K^{+} -ATPase in rats with streptozotocin-induced diabetes *Gen Physiol Biophys* 25(2): 111–124.
39. *Vér A, Szántó I, Bányász T, Cserehely P, Végh E, Somogyi J* (1997) Changes in the expression of Na^{+} / K^{+} -ATPase isoenzymes in the left ventricle of diabetic rat hearts: effect of insulin treatment. *Diabetologia* 40: 1255–1262. <https://doi.org/10.1007/S001250050818>
40. *Howarth FC, Parekh K, Jayaprakash P, Inbaraj ES, Oz M, Dobrzynski H, Adrian TE* (2017) Altered profile of mRNA expression in atrioventricular node of streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Med Rep* 16(4): 3720–3730. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7038>
41. *Chistyakova OV, Sukhov IB, Kubasov IV, Dobretsov MG* (2020) The study of rat myocardial Na/K -ATpase activity in experimental conditions of prediabetes and diabetes mellitus. *J Evol Biochem Physiol* 56: 166–168. <https://doi.org/10.31857/S0044452920020047>
42. *Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, Guatimosim S, Jonathan Lederer W, Matlib MA* (2002) Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(4): H1398–H1408. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00313.2002>
43. *Zhong Y, Ahmed S, Grupp IL, Matlib MA* (2001) Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1137–H1147.
44. *Haghighi K, Bidwell P, Kranias EG* (2014) Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *J Mol Cell Cardiol* 77: 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.10.005>
45. *Wang M, Zhang WB, Zhu JH, Fu GS, Zhou BQ* (2010) Breviscapine ameliorates cardiac dysfunction and regulates the myocardial Ca^{2+} -cycling proteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Diabetol* 47 Suppl 1: 209–218. <https://doi.org/10.1007/s00592-009-0164-x>
46. *Vasanji Z, Dhalla NS, Netticadan T* (2004) Increased inhibition of SERCA2 by phospholamban in the type I diabetic heart. *Mol Cell Biochem* 261(1–2): 245–249. <https://doi.org/10.1023/b: mcbi.0000028762.97754.26>
47. *Fosmo AL, Skraastad ØB* (2017) The Kv7 channel and cardiovascular risk factors. *Front Cardiovasc Med* 4: 314626. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2017.00075/BIBTEX>
48. *Lengyel C, Virág L, Biró T, Jost N, Magyar J, Biliczki P, Kocsis E, Skoumal R, Nánási PP, Tóth M, Kecskeméti V, Papp JG, Varró A* (2007) Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc Res* 73(3): 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.11.010>

Study of Na⁺/K⁺-ATPase and Components of the Ca²⁺-transporting System in Myocardium under Experimental Prediabetes and Type 1 Diabetes in Rats

I. B. Sukhov^{a,*}, O. V. Chistyakova^a, and M. G. Dobretsov^a

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

** e-mail: sukhov.ivan@gmail.com*

One of the complications of diabetes mellitus (DM) is diabetic cardiomyopathy (DCM), the molecular mechanisms of pathogenesis of which have not been fully studied. Previously, the involvement of Na⁺/K⁺-ATPase and components of the Ca²⁺ transport system in cardiomyocytes in the development of DCM was shown. The aim of the work was to study the expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase (SERCA2) in the myocardium of male Wistar rats in a model of streptozotocin (STZ)-induced prediabetes and overt type 1 diabetes (T1DM). STZ was administered at once i.p. in dose of 30–35 mg/kg. Rats with glucose levels above 11 mM were considered diabetic (STZ-D1 group), and those with moderate hyperglycemia were considered prediabetic (STZ-preD1 group). The activity of Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase was determined (by the rate of release of inorganic phosphate, Pi), and the expression of the genes α 1- and α 2-isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase, SERCA2 and Kir6.1, Kv7.1 and Kv2.1 potassium channels. In the control (C) group, the activity of Mg²⁺-dependent ATPase (α 1- and α 2-isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase), sensitive to 1 mM ouabain, was 6.03±0.6 mmol Pi/g/h. In the STZ-D1 and STZ-preD1 groups, Na⁺/K⁺-ATPase activity did not differ from group C. The level of gene expression of α 1- and α 2- subunits of Na⁺/K⁺-ATPase in the STZ-D1 group decreased by more than 45%, then both in the STZ-preD1 group increased by 64 and 81%, which may indicate a high sensitivity of expression to insulinopenia. The activity of Ca²⁺-ATPase and the expression of the SERCA2 gene did not differ between the groups – probably, the 4-week period after STZ administration is not sufficient for the development of Ca²⁺-ATPase deficiency in the rat heart. The level of expression of the genes of the potassium channel subtypes Kv2.1, Kir6.1 and Kv7.1 increased in the STZ-preD1 group, which may indicate a certain contribution of the studied potassium channel subtypes to the adaptation mechanism to moderate hyperglycemia.

Keywords: diabetes mellitus, prediabetes, diabetic cardiomyopathy, Na⁺/K⁺-ATPase, SERCA2, insulin, rat

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ГОНАДОТРОПНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ЯИЧНИКОВ
В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ПСИХОСОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА
НА КАЧЕСТВО ООЦИТОВ МЫШЕЙ**

© 2024 г. Д. А. Лебедева¹, Т. Н. Игонина^{1,*}, Е. Ю. Брусенцев¹, Н. А. Шавшаева^{1,2},
С. Я. Амстиславский¹

¹*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия*

²*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

**E-mail: egik_00@mail.ru*

Поступила в редакцию 22.03.2024 г.

После доработки 26.04.2024 г.

Принята к публикации 02.05.2024 г.

Хронический психосоциальный стресс может оказывать негативное влияние на женскую репродуктивную систему. Между тем влияние стимуляции яичников гонадотропинами на фоне стресса на качество ооцитов остается слабо изученным. Целью настоящей работы было изучение влияния хронического психосоциального стресса на качество кумулюс-ооцитных комплексов у мышей при естественном эстральном цикле, а также при стимуляции яичников экзогенными гонадотропинами, что является важной частью современного комплекса вспомогательных репродуктивных технологий. Результаты исследования показали, что психосоциальный стресс не влияет на число овулирующих ооцитов, однако ухудшает их качество, выражающееся в сниженном проценте зрелых форм. Кроме того, у самок мышей на фоне стресса было обнаружено повышенное накопление активных форм кислорода в ооцитах, сопровождающееся повышенным апоптозом в кумулюсных клетках. Гормональная стимуляция яичников с помощью гонадотропинов оказывала смягчающий эффект на негативные изменения, связанные с психосоциальным стрессом, нормализуя уровень накопления активных форм кислорода в ооцитах и снижая уровень апоптоза в кумулюсных клетках.

Ключевые слова: хронический психосоциальный стресс, гонадотропины, кумулюс-ооцитные комплексы, окислительный стресс, апоптоз, мыши

DOI: 10.31857/S0869813924060044, EDN: BFBDSK

ВВЕДЕНИЕ

Проблема бесплодия на сегодняшний день является актуальной во всем мире. Доля пар репродуктивного возраста неспособных зачать ребенка без помощи медицины колеблется от 12.6 до 17.5% [1]. Причины, лежащие в основе возникновения бесплодия, условно можно разделить на две большие группы: патологии репродуктивной системы и образ жизни человека [2]. При этом во втором случае взаимосвязь между причиной и следствием достаточно размыта. В последнее время исследователи ставят вопрос

о роли хронического психосоциального стресса в нарушении фертильности, что связано с ускорением ритма современной жизни, способствующим повышению психической и эмоциональной нагрузки на человека [3].

Известно, что хронический стресс может приводить к нарушениям в женской репродуктивной системе, в частности, к недоразвитию фолликулов, ановуляции и недостаточности лютеиновой фазы вследствие ослабления функции желтого тела [4, 5]. Более того, стрессирующие воздействия могут приводить к снижению качества ооцитов и, как следствие, к снижению жизнеспособности преимплантационных эмбрионов [6, 7]. Однако механизмы влияния психологического стресса на репродуктивную функцию недостаточно изучены.

Негативное влияние хронического стресса на яичник рассматривается в основном через взаимодействие гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГНС) и гипоталамо-гипофизарно-гонадной (ГГГС) систем [8, 9]. В ответ на стрессирующие воздействия происходит активация ГГНС, что сопровождается высвобождением глюкокортикоидов [10]. При этом ГГНС опосредованно влияет на рост и созревание половых клеток, синтез стероидных гормонов в яичниках, воздействуя на ГГГС. Известно, что глюкокортикоиды угнетающе воздействуют на органы женской репродуктивной системы [9, 11]. Между тем относительно недавно был открыт и исследован гонадотропин-ингибирующий гормон (ГниГ, гонадоингибин), являющийся важной частью ГГНС; этот нейрогормон синтезируется в мозге и может влиять на активность ГГГС и половое поведение [12]. При стрессе происходит усиление активности нейронов, выделяющих ГниГ, при этом снижается высвобождение гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ), из-за чего нарушается секреция фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов. В совокупности это оказывает негативный эффект на функции яичников [10].

В связи с бурным развитием и широким внедрением в практику вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [13] все чаще встает вопрос о том, каким образом и посредством каких механизмов психоэмоциональный стресс может повлиять на репродуктивные исходы [3]. Ранее было показано, что психологический стресс может оказывать влияние на результативность применения ВРТ для лечения бесплодия [14].

Стимуляция яичников гонадотропинами является важнейшей частью современного комплекса ВРТ в медицине [15, 16]. Кроме того, гонадотропная стимуляция яичников применяется в подавляющем большинстве исследований на лабораторных мышах и других животных с целью получения ооцитов и преимплантационных эмбрионов [17, 18]. Между тем влияние стимуляции гонадотропинами на качество ооцитов на фоне стресса остается слабо изученным [19, 20]. Вопрос о том, возможно ли введением экзогенных гонадотропинов смягчить негативные эффекты хронического стресса на функцию яичников, и как это скажется на качестве ооцитов остается до сих пор открытым.

Для изучения влияния хронического психосоциального стресса на репродуктивную систему используют как сбор клинических данных [2, 21], так и исследования на экспериментальных животных [9, 22]. При этом популярны модели хронического непредсказуемого стресса, при котором животное помещается в непредсказуемые стрессирующие ситуации, и рестрикционная модель, включающая ограничение подвижности животного [3, 23]. Существенным недостатком данных моделей является то, что в них используются виды стресса, не имеющие сходства с повседневными стрессовыми факторами современного человека. Кроме того, эти модели приводят к потере веса, что негативно сказывается на физическом состоянии животных [24]. Одним из наиболее адекватных подходов для моделирования хронического психосоциального стресса является, на наш взгляд, чередование изоляции и скученности, что позволяет вызывать психогенный стресс без физического воздействия на животного [25].

Целью нашего исследования явилось изучение эффектов хронического психосоциального стресса на качество ооцитов мышей при естественном эстральном цикле, а также при применении стимуляции яичников экзогенными гонадотропинами.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Исследования проводили на мышах линии CD1 из SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках размерами 36 x 25 x 14 см (длина x ширина x высота) с подстилом из древесной стружки, при температуре 22–24 °C, цикл день/ночь: 14 ч/10 ч (рассвет в 3 ч ночи), влажность 40–50%, со свободным доступом к стандартному корму (V1534–300, Ssnif, Soest, Германия) и очищенной воде, обогащенной минеральными добавками (Северянка, Экопроект, Россия). Эксперименты были проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” Института цитологии и генетики СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Дизайн эксперимента

Самки мышей в возрасте 8–12 недель были случайным образом распределены на четыре группы (рис. 1):

- 1) Контроль (естественный эстральный цикл, без стрессирующих воздействий);
- 2) Контроль + СО (индуцированная суперовуляция, без стрессирующих воздействий);
- 3) Стресс (естественный эстральный цикл, воздействие стрессирующих факторов);
- 4) Стресс + СО (индуцированная суперовуляция, воздействие стрессирующих факторов).

Хронический психосоциальный стресс был вызван согласно ранее описанной методике [25], а именно: животных опытной группы содержали в изоляции (по одной самке в клетке) в течение 11 дней с последующим нахождением животных в условиях скученности (по 11 самок в клетке) последующие 10 дней (рис. 1). Таким образом, длительность эксперимента составляла 21 день. Животных контрольной группы содержали в стандартных условиях в группах по 5 самок на клетку. Эффективность применяемой процедуры для вызывания стрессовой реакции была подтверждена ранее [25] посредством определения уровня кортикостерона в плазме крови.

У самок мышей определяли стадию цикла по вагинальным мазкам как описано ранее [26]. Для гормональной стимуляции яичников (группы Контроль + СО и Стресс + СО) самкам мышей на стадии диэструса вводили внутримышечно 10 МЕ гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК, фоллигон, Intervet, Нидерланды), затем, через 46 ч внутримышечно вводили 5 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГЧ, хорулон, Intervet, Нидерланды), что является общепринятым протоколом стимуляции яичников мышей [27]. Для исследования самок с естественным эстральным циклом (группы Контроль и Стресс) были взяты только самки на стадии эструса. По окончании эксперимента мышей подвергали эвтаназии с помощью CO₂, затем собирали кумулюсоцитные комплексы для последующих исследований (рис. 1).

Исследование крови на уровень кортикостерона

Туловищную кровь (0.5–0.7 мл) собирали в центрифужные пробирки после декапитации животных, отстаивали в течение 25 мин при комнатной температуре до полного образования сгустка, центрифугировали (850 g, 10 мин) при комнатной температуре; экстрагированную сыворотку хранили при –20 °C до анализа гормонов. Концентрацию сывороточного кортикостерона измеряли методом иммуноферментного анализа с использованием набора Elisa (Cloud-Clone Corp., США) согласно инструкции производителя. Оптическую плотность измеряли при 450 нм с помощью планшет-ридера (Thermo Fisher Scientific, США) через 15 мин после остановки реакции добавлением стоп-раствора. Концентрацию кортикостерона рассчитывали по соответствующей калибровочной кривой.

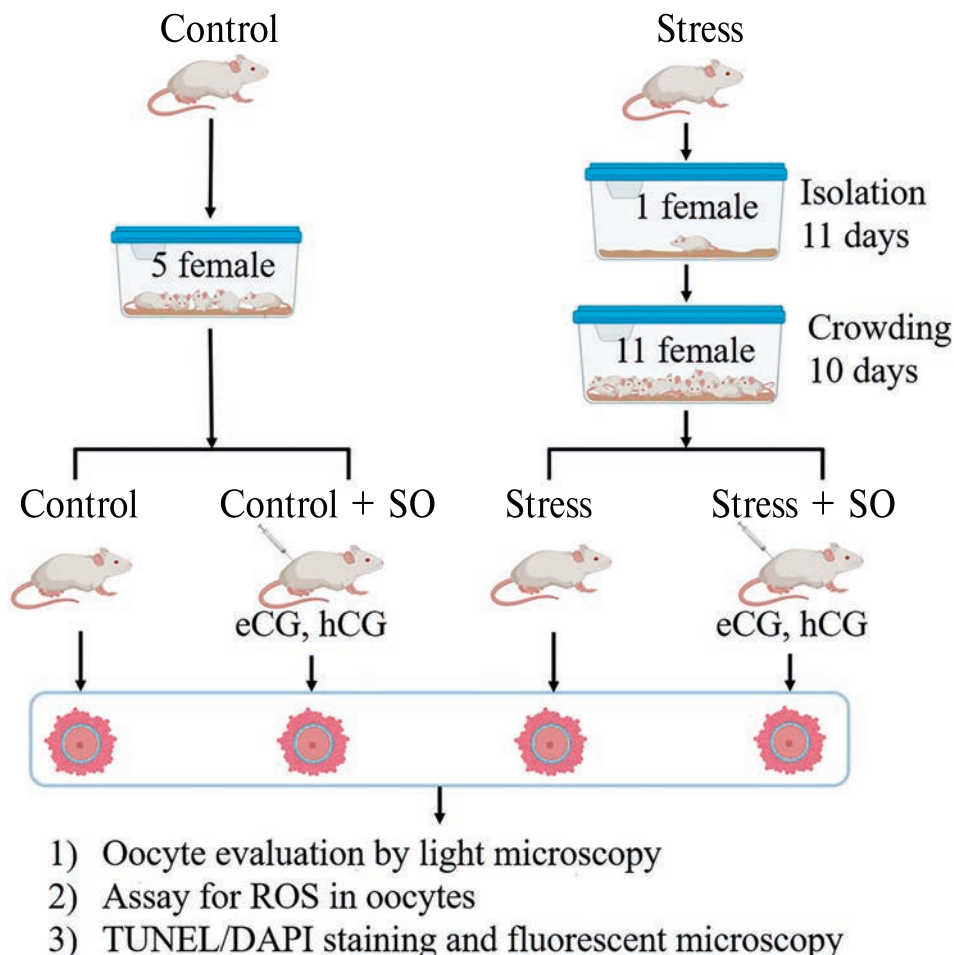


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

Группы: Control – intactные самки с естественным эстральным циклом; Control + SO – самки с индуцированной суперовуляцией; Stress – стрессированные самки с естественным эстральным циклом; Stress + SO – стрессированные самки с индуцированной суперовуляцией.

Получение кумулюс-ооцитных комплексов

Кумулюс-ооцитные комплексы (КОК) собирали из ампулярных отделов яйцеводов. У самок с индуцированной суперовуляцией (группы Контроль + СО и Стресс + СО) выделение КОК проводили через 16–17 ч после инъекции ХГЧ. Самки с естественным эстральным циклом (группы Контроль и Стресс) на стадии эструса были ссажены с вазэктомированными самцами на ночь, утром следующего дня у самок, имеющих вагинальные пробки после спаривания, выделяли КОК из ампул яйцеводов. Выделенные КОК анализировали с помощью стереомикроскопа S80 APO (Leica, Германия). После микроскопического анализа был изучен уровень активных форм кислорода (АФК) в ооцитах и число апоптотических клеток в КОК, как описано ниже.

Накопление АФК в ооцитах

Для исследования накопления АФК в ооцитах проводили окрашивание 10 мкМ 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин-диацетатом (H2DCFDA, Lumiprobe, Россия), растворенным в среде НТФ при 38 °С в условиях CO₂-инкубатора в течение 30 мин. После инкубации ооциты были трижды промыты в среде FertiCult Flushing medium (FertiPro, Бельгия), а затем перенесены в чистые капли этой среды на стекла с лунками (Микромед, Россия) и покрыты покровным стеклом. Проникающий в клетки H2DCFDA, после отщепления ацетильных групп внутриклеточными эстеразами, флуоресцирует в зеленой области спектра при облучении зеленым светом (максимум поглощения при 511 нм). Интенсивность флуоресценции ооцитов после воздействия H2DCFDA была измерена с использованием микроскопа ZEISS Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Германия) при длине волны 488 нм. Уровни АФК в ооцитах оценивали количественно путем определения интенсивности флуоресценции в цитоплазме ооцитов с помощью программы ImageJ, как описано ранее [28].

Окрашивание TUNEL и DAPI

Исследование апоптоза в кумулюсных клетках производили при помощи набора TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) FITC Apoptosis Detection Kit (Vazyme, Китай), согласно протоколу производителя. КОК фиксировали на адгезивном стекле, после чего трижды промывали фосфатно-солевым буфером (ФБС), а затем обрабатывали протеиназой К в течение 12 мин при комнатной температуре с целью повышения проницаемости мембран. После трех промываний в ФБС с дальнейшим инкубированием в буфере для уравнивания в течение 15 мин, КОК подвергали воздействию раствора TUNEL в течение одного часа при 37 °С. Затем КОК трижды промывали ФБС перед добавлением флуорохрома DAPI. Кроме того, осуществляли позитивный контроль (воздействие на ооциты ДНКазы в течение 10 мин перед окрашиванием TUNEL) и негативный контроль (инкубация в растворе TUNEL, приготовленного без добавления рекомбинантного TdT энзима). Анализ проводили с помощью микроскопа AxioImager.M2 (Carl Zeiss, Германия) с фильтрами, подходящими для DAPI и FITC. Подсчет общего числа ядер и апоптотических клеток кумулюса производили путем визуальной оценки препаратов с использованием программы ImageJ, как описано ранее [29].

Статистика

Для статистического анализа использовали стандартный пакет программ STATISTICA v. 8.0 StatSoft Inc. Учитывая отсутствие нормального распределения по Колмогорову-Смирнову, данные по накоплению АФК и числу апоптотических клеток в КОК были проанализированы с использованием критерия Краскела-Уоллеса и затем представлены в виде медианы и 25–75% квартилей, максимального и минимального выборочного значения. Данные по числу ооцитов, а также по проценту зрелых и незрелых ооцитов имели нормальное распределение по Колмогорову-Смирнову и были проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным сравнением с использованием критерия Фишера LSD. Данные по проценту деградирующих ооцитов имели ненормальное распределение и были проанализированы с использованием критерия Краскел-Уолеса. Данные по уровню кортикостерона в крови имели нормальное распределение и были проанализированы с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия при значении $p < 0.05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффективность применяемой процедуры для вызывания стрессовой реакции была подтверждена посредством определения уровня кортикостерона в сыворотке крови.

У самок мышей, подвергнутых стрессу, наблюдался повышенный уровень кортикостерона ($p < 0.01$) в крови по сравнению с интактными самками контрольной группы (табл. 1).

Хронический психосоциальный стресс не оказывал влияния на число овулированных ооцитов ($F_{(1, 43)} < 1$). В то же время воздействие на самку гонадотропными гормонами с целью вызвать суперовуляцию достоверно повышало число овулированных ооцитов ($F_{(1, 43)} = 72.1, p < 0.05$), как в контрольных группах (соответственно: 13.0 ± 0.7 без стимуляции и 38.0 ± 3.8 после стимуляции, $p < 0.001$), так и в стрессовых группах (соответственно: 13.4 ± 0.5 без стимуляции и 35.7 ± 3.9 после стимуляции, $p < 0.001$).

Таблица 1. Уровень кортикостерона в крови у интактных и подвергнутых стрессу самок

Группа (число животных)	Кортикостерон (нг/мл)
Контроль ($n = 12$)	246.4 ± 52.5
Стресс ($n = 16$)	$449.8 \pm 42.8^{**}$

Данные представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартная ошибка среднего. $^{**} p < 0.01$ по сравнению с группой контроль.

Хронический психосоциальный стресс оказывал статистически значимое влияние на созревание ооцитов ($F_{(2, 42)} = 3.3, p < 0.05$), при этом влияние стимулирования суперовуляции было лишь на уровне тенденции ($F_{(2, 42)} = 3.1, p = 0.057$). Статистически значимых различий в проценте деградирующих ооцитов между исследуемыми группами не выявлено ($H(3, N = 47) = 7.04, p > 0.05$). У самок мышей, подвергнутых хроническому психосоциальному стрессу, наблюдался сниженный процент зрелых ооцитов с полярным телом как при естественном цикле ($p < 0.05$), так и после стимулирования яичников гонадотропинами ($p < 0.01$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2). При введении гонадотропинов с целью суперовуляции у самок контрольной группы процент незрелых форм ооцитов возрастал ($p < 0.05$). У стрессированных самок суперовуляторное воздействие гонадотропинами не оказывало влияние на долю зрелых и незрелых ооцитов. Кроме того, после гормональной стимуляции наблюдали случаи партеногенеза, причем в группе Стресс + СО данное явление встречалось реже ($p < 0.05$), чем в группе Контроль + СО (1.1% и 3.9% соответственно).

В результате окрашивания 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин-диацетатом было выявлено повышенное накопление АФК в цитоплазме ооцитов при стрессе ($p < 0.001$, рис. 3).

Гормональная стимуляция суперовуляции снижала уровень накопления АФК в ооцитах у стрессированных самок до уровня контрольных самок. У нестрессированных животных уровни накопления АФК в ооцитах как при гонадотропной стимуляции яичников, так и при естественном эстральном цикле не различались.

Исследование с применением красителя TUNEL и последующей флуоресцентной микроскопией выявило возрастание числа апоптотических клеток в КОК самок мышей, подвергнутых стрессу ($p < 0.01$) по сравнению с контрольной группой (рис. 4).

Гормональная стимуляция суперовуляции снижала число апоптотических клеток кумулюса у стрессированных самок до уровня контрольных. Число апоптотических клеток в кумулюсе у самок мышей из контрольных групп как при стимуляции овуляции, так и при естественном эстральном цикле не различались.

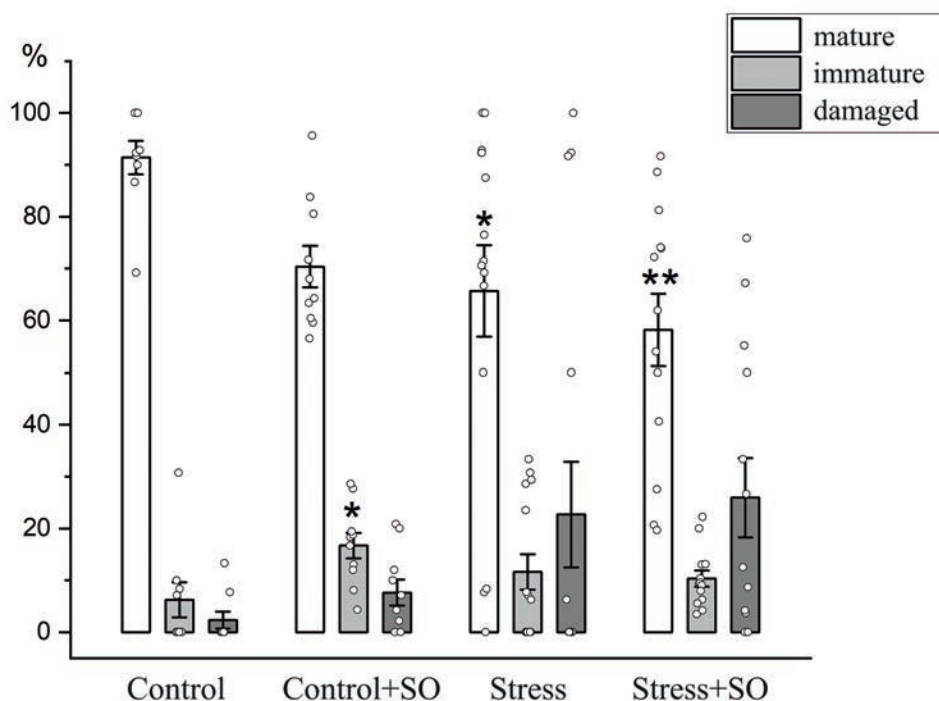


Рис. 2. Характеристики ооцитов у интактных и подвергнутых стрессу самок.

Данные представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с группой Контроль. Число самок/общее число ооцитов в группах Контроль (Control) – 9/117, Контроль + СО (Control + SO) – 10/380, Стресс (Stress) – 15/201, Стресс + СО (Stress + SO) – 13/464.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании самки мышей были подвергнуты хроническому психосоциальному стрессу, а именно: изоляции с последующим содержанием в скученных условиях по ранее описанному протоколу, который был разработан по отношению к самцам крыс [25]. У самок мышей, подвергнутых стрессу, был повышен уровень кортикостерона, который является маркером стрессовой реакции, что верифицирует выбранную модель стресса применительно к самкам мышей.

Хронический психосоциальный стресс не оказывал влияние на общее число овулированных ооцитов у самок мышей при естественном цикле. Для стимуляции яичников мы использовали стандартную схему, а именно последовательное введение 5–10 МЕ ГСЖК в сочетании с введением 5 МЕ ХГЧ через 46–48 ч [17]. Наше исследование показало, что гормональная стимуляция с использованием данной схемы гонадотропного воздействия приводит к получению большего числа ооцитов. При этом число ооцитов у самок, подвергнутых стрессу, было сопоставимо с контролем. Полученные нами результаты согласуются с исследованиями Tsuji с соавт. [30], которые показали, что хронический рестрикционный стресс не влияет на число ооцитов после гормональной стимуляции яичников. Тем не менее в некоторых работах показано, что хронический непредсказуемый стресс может снижать число овулированных ооцитов мышей при

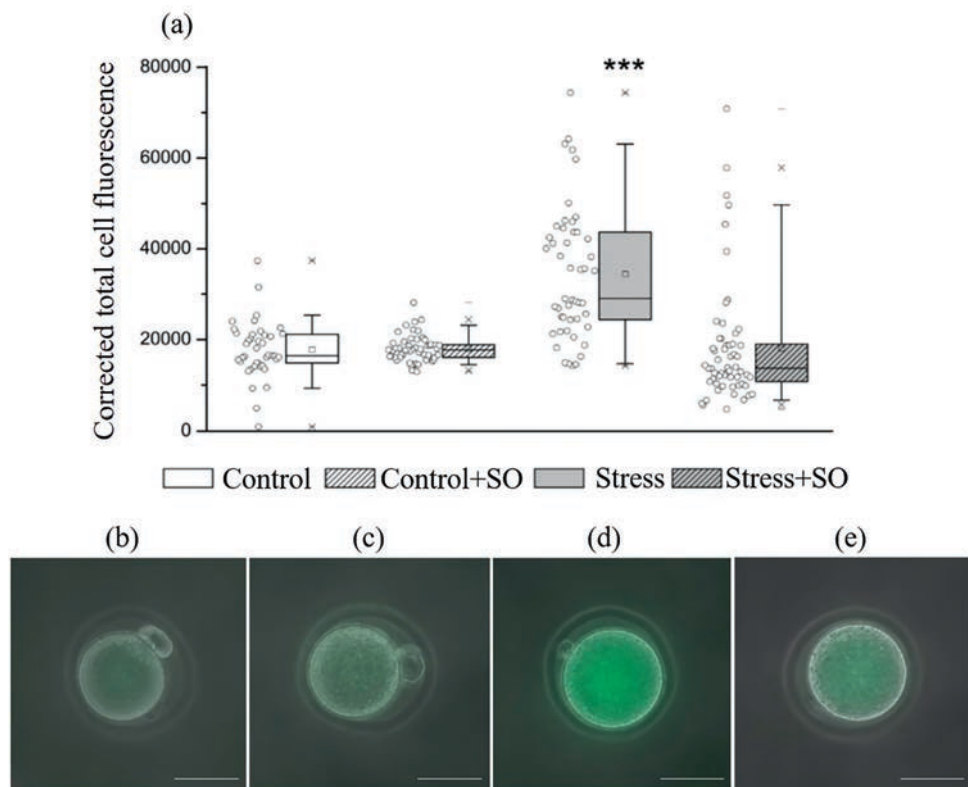


Рис. 3. Уровни накопления активных форм кислорода в цитоплазме ооцитов у intactных и стрессированных самок.

(a) – интенсивность флуоресценции; (b - d) – репрезентативные изображения ооцитов, окрашенных 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин-диацетатом: (b) – Контроль, (c) – Контроль + CO, (d) - Стресс, (e) – Стресс + CO. Шкала = 50 мкм. Данные представлены как медиана и 25 - 75% квантили. *** $p < 0.001$ по сравнению с группой Контроль (Control).

применении гонадотропной стимуляции [31]. Эти противоречия могут быть связаны с длительностью и тяжестью воздействия стрессирующих факторов, которые различаются в разных моделях стресса [22, 23].

Наше исследование показывает, что при сравнимом с intactными самками числе овулирующих ооцитов, хронический психосоциальный стресс приводит к ухудшению их качества. Процент зрелых ооцитов на стадии МП был снижен при стрессе, как при естественном цикле, так и после гормональной стимуляции яичников. Наши результаты соответствуют выводам предыдущих исследований [19, 32, 33]. Ранее было показано, что после стрессового воздействия овулированные ооциты находились на стадии герминального везикула (GV), либо на стадии МП, то есть отставали в своем мейотическом созревании [19]. Стресс может приводить к нарушению процесса мейоза в ооцитах [32, 33]. Было установлено, что стресс сопровождается нарушением связей между ооцитом и клетками кумулюса [33], а также вызывает аномалии веретена деления в ооцитах на стадии метафаза II и задержку перехода ооцитов в фазу метафаза I [32], что в конечном итоге выражается в возрастании доли разрушенных и незрелых ооцитов.

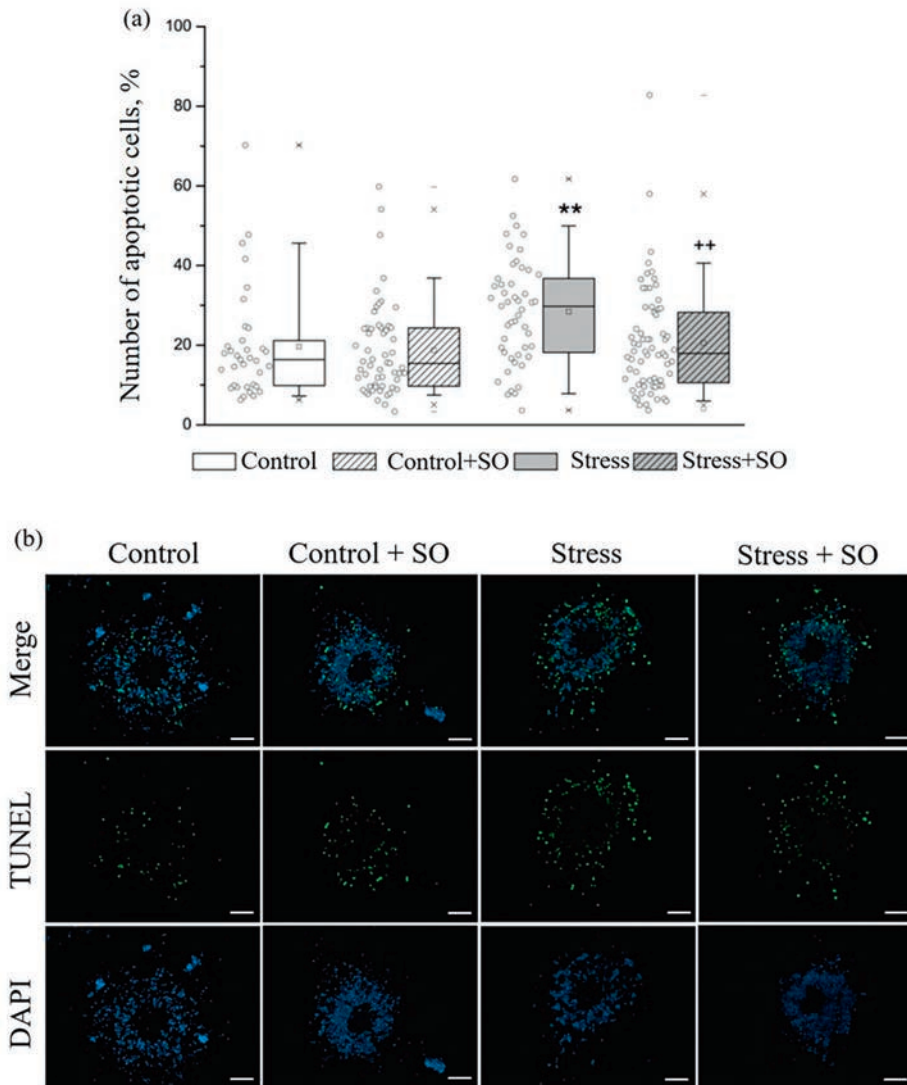


Рис. 4. Уровень апоптоза в кумулюсных клетках у стрессированных самок и самок, не подвергавшихся стрессу. (a) – процент апоптотических клеток в КОК; (b) – репрезентативные изображения ооцитов, окрашенных TUNEL/DAPI. Шкала = 50 мкм. Данные представлены как медиана и 25 – 75% квантили. ** $p < 0.01$ по сравнению с группой Контроль (Control); ** $p < 0.01$ по сравнению с группой Стресс (Stress).

Ранее было установлено, что чем тяжелее и продолжительнее стресс, тем в большей мере он отражается на развитии ооцитов мышей [23]. Длительный стресс может приводить к существенному истощению интраовариального резерва фолликулов, это касается как примордиальных и первичных, так и вторичных фолликулов [34].

Согласно нашим данным, гонадотропная стимуляция яичников приводила к увеличению доли незрелых ооцитов у контрольных самок мышей. При этом на фоне стрес-

са качество овулированных ооцитов после гормональной стимуляции не изменялось, и в целом было ниже по сравнению с интактным контролем. Существуют исследования, показывающие снижение процента зрелых ооцитов, а также повышение числа атретических фолликулов при гонадотропной стимуляции яичников мышей в сравнении с естественной овуляцией [35, 36]. В нескольких исследованиях выявлено изменение морфологии в ооцитах, полученных в результате применения экзогенных гонадотропинов [35, 37, 38]. В частности, в ооцитах, полученных после суперовуляции, обнаружено снижение активности митохондрий и больший процент деформированных митохондрий [35], утончение прозрачной оболочки и уменьшение размера ооцита [37, 38], а также ряд других ультраструктурных аномалий. Этот специфический фенотип ооцитов и полученных из них эмбрионов сопряжен с изменением экспрессии не менее 92 генов в сравнении с естественно овулированными ооцитами [37, 38].

В нашем исследовании показано, что хронический психосоциальный стресс приводит к повышенному накоплению АФК в ооцитах у самок мышей. С одной стороны, АФК играют важную роль в регуляции овариального цикла, разрыве фолликула, поддержании желтого тела и его регрессии [39]. С другой стороны, чрезмерное накопление АФК провоцирует окислительные процессы, которые могут сопровождаться блокированием мейоза [4]. При этом происходит преждевременный разрыв связей ооцита с кумулюсными клетками, что препятствует поступлению необходимых питательных веществ и ростовых факторов к ооциту и в конечном итоге приводит к апоптозу [4]. Неблагоприятные факторы, в том числе стресс, могут вызывать повышенную выработку АФК [9]. Чрезмерное накопление АФК может быть одним из факторов, снижающих качество овулирующих ооцитов при стрессе, что мы наблюдали в настоящем исследовании.

Результаты нашей работы показывают, что применение гонадотропинов для стимуляции яичников не оказывает влияния на уровень накопления АФК в ооцитах контрольных нестрессированных самок мышей. В то же время стимуляция яичников гонадотропинами на фоне стресса нивелирует повышенный уровень накопления АФК, наблюдаемый при естественной овуляции, возвращая тем самым окислительный статус ооцитов в состояние аналогичное контролю. Данные по влиянию гонадотропинов на уровень накопления АФК противоречивы, что может быть связано с различиями в протоколах исследований [40, 41]. В работе Guo с соавт. [42] показано, что у самок, подвергнутых хроническому рестрикционному стрессу с последующей стимуляцией яичников гонадотропинами, происходит чрезмерное накопление АФК в ооцитах по сравнению с контролем. В нашем исследовании уровень накопления АФК в ооцитах стрессированных и нестрессированных самок мышей после введения гонадотропинов не отличался. Эти различия в результатах исследований могут быть объяснены разной интенсивностью стрессовой реакции; в нашем исследовании использовался более мягкий стрессовый стимул, который не приводил к столь сильному повреждению ооцитов.

Стоит отметить, что для исследования уровня АФК также важен «возраст» ооцита [43], а именно, сколько времени прошло после гормональной стимуляции яичников, а также состояние антиоксидантной системы [44]. Chen с соавт. [43] показали, что ооциты, полученные от стрессированных самок после 19 ч с момента введения ХГЧ, имеют повышенный уровень АФК по сравнению с нестрессированными самками, тогда как до этого срока различий не наблюдалось. Наши результаты по уровню АФК были получены на ооцитах, выделенных после 16 ч с момента введения ХГЧ, и в целом не противоречат результатам Chen с соавт. [43]. Кроме того, мы наблюдали некоторый положительный эффект от гонадотропной стимуляции яичников на уровень накопления АФК при стрессе, а именно, нормализацию АФК до уровня нестрессированных самок. Механизмы, лежащие в основе обнаруженного эффекта, требуют дальнейшего изучения.

В нашем исследовании показано, что психосоциальный стресс приводит к увеличению уровня апоптоза в кумулюсных клетках ооцитов при естественном цикле. При этом стимуляция яичников гонадотропинами на фоне стресса снижала число клеток, подвергнутых апоптозу до уровня контрольных самок. Данные литературы о влиянии психосоциального стресса на апоптоз в КОК на фоне естественного овариального цикла отсутствуют. Во всех известных нам работах, направленных на изучение апоптоза в кумулюсных клетках, для получения КОК используют суперовуляторные схемы с применением экзогенных гонадотропинов, и влияние фактора стимуляции яичников гонадотропинами не рассматривают отдельно от стрессового воздействия. В работах на мышах с использованием модели рестрикционного стресса с применением ГСЖК с целью стимуляции яичников было показано, что стресс приводит к увеличению апоптоза в кумулюсных и в пристеночных гранулезных клетках, что ухудшает потенциал развития ооцитов [45, 46]. Моделирование стресса путем введения мышам кортизола через 24 ч после введения ГСЖК также способствует увеличению апоптоза в кумулюсных клетках [47]. Однако в нашем исследовании психосоциальный стресс, вызванный содержанием животных в изоляции с последующим помещением в условия скученности в сочетании с введением гонадотропинов, не приводил к увеличению апоптоза в клетках кумулюса, что может быть связано с выбранной моделью стрессового воздействия, а также особенностями схемы гормональной стимуляции яичников.

Нами впервые было обнаружено снижение уровня апоптоза в КОК, полученных из яичников стрессированных животных, при применении схемы гонадотропной стимуляции яичников. Механизм такого «защитного» действия гонадотропных гормонов может быть связан с их стимулирующим действием на яичники, что может запускать антистрессовые механизмы [48]. Известно, в частности, что воздействие гонадотропными гормонами приводит к повышению концентрации эстрадиола и прогестерона в крови у человека и животных, хотя этот эффект зависит от вида млекопитающих, дозировки вводимого препарата гонадотропина и индивидуальной чувствительности [49, 50]. Эстрогены, в свою очередь, вызывают повышение уровня кортикостероидсвязывающего глобулина, тем самым уменьшая количество свободного кортикостерона, доступного в тканях-мишенях [48], что и может объяснить протективный эффект гонадотропной стимуляции, наблюдавшийся в наших экспериментах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что психосоциальный стресс ухудшает качественный состав ооцитов, снижая процент зрелых форм, а также приводит к накоплению АФК в ооцитах и возрастанию апоптоза в кумулюсных клетках. Стимуляция стрессированных самок гонадотропинами приводила к снижению накопления АФК и числа апоптотических клеток в кумулюс-ооцитных комплексах до уровня нестрессированных самок. Таким образом, гормональная стимуляция яичников способна снизить вызванный стрессом окислительный стресс в клетках кумулюс-ооцитных комплексов и тем самым улучшить качество ооцитов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Авторы Т. Н. И., Д. А. Л. и С. Я. А.), сбор данных (Д. А. Л., Т. Н. И., Н. А. Ш.), обработка данных (Д. А. Л., Ш. Н. А.), написание и редактирование манускрипта (Д. А. Л., Е. Ю. Б., Т. Н. И. и С. Я. А.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект № 23–25–00139). 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 Комитетом по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (Протокол № 143 от 15.03.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cox C., Thoma ME, Tchangelova N, Mburu G, Bornstein MJ, Johnson CL, Kiarie J (2022) Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Open* 2022(4). <https://doi.org/10.1093/hropen/hoac051>
2. Тювина НА, Николаевская АО (2019) Бесплодие и психические расстройства у женщин. сообщение 2. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика* 11(4): 117–124. [Tyuvina NA, Nikolaevskaya AO (2019) Infertility and mental disorders in women. *Communication 1. Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics* 11(4): 117–124. (In Russ)]. <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2019-4-117-124>
3. Левинсон АЛ, Игонина ТН, Рожкова ИН, Брусенцев ЕЮ, Амстиславский СЯ (2022) Психоземotionalный стресс, фолликулогенез и репродуктивные технологии: клинические и экспериментальные данные. Вавилов журн генетики и селекции 26(5): 431–441. [Levinson AL, Igonina TN, Rozhkova IN, Brusentsev EYu, Amstislavsky SYa (2022) Psycho-emotional stress, folliculogenesis, and reproductive technologies: clinical and experimental data. *Vavilov J Genetics and Breeding* 26(5): 431–441. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-53>
4. Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, Shrivastav TG, Chaube SK (2016) Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *J Biomed Sci* 23: 36. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0253-4>
5. Zhou FJ, Cai YN, Dong YZ (2019) Stress increases the risk of pregnancy failure in couples undergoing IVF. *Stress* 22(4): 414–420. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1584181>
6. Zhang SY, Wang JZ, Li JJ, Wei DL, Sui HS, Zhang ZH, Zhou P, Tan JH (2011) Maternal Restraint Stress Diminishes the Developmental Potential of Oocytes. *Biol Reproduction* 84(4): 672–681. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087890>
7. Zhao X, Ma R, Zhang X, Cheng R, Jiang N, Guo M, Rong B, Liu Y, Chen M, Feng W, Xia T (2021) Reduced growth capacity of preimplantation mouse embryos in chronic unpredictable stress model. *Mol Reproduction Development* 88(1): 80–95. <https://doi.org/10.1002/mrd.23439>
8. Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos GP (2004) Stress and the female reproductive system. *J Reprod Immunol* 62(1–2): 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2003.09.004>
9. Zhai QY, Wang JJ, Tian Y, Liu X, Song Z (2020) Review of psychological stress on oocyte and early embryonic development in female mice. *Reproduction Biol Endocrinol* 18(1): 101. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00657-1>
10. Joseph D, Whirledge S (2017) Stress and the HPA Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. *Int J Mol Sci* 18(10): 2224. <https://doi.org/10.3390/ijms18102224>
11. Michael TE, Pester LA, Curtis P, Shaw RW, Edwards CRW, Cooke BA (1993) Direct inhibition of ovarian steroidogenesis by cortisol and the modulatory role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin Endocrinol* 38(6): 641–644. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1993.tb02147.x>
12. Tsutsui K, Ubuka T, Son YL, Bentley GE, Kriegsfeld LJ (2015) Contribution of GnIH Research to the Progress of Reproductive Neuroendocrinology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6: 179. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00179>
13. Abdullah KAL, Atazhanova T, Chavez-Badiola A, Shivhare SB (2023) Automation in ART: Paving the Way for the Future of Infertility Treatment. *Reprod Sci* 30(4): 1006–1016. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-00941-y>

14. *Ebbesen SM, Zachariae R, Mehlsen MY, Thomsen D, Højgaard A, Einarsson S, Brandt Y, Lundeheim N, Madej A* (2008) Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. *Acta Veter Scand* 50(1): 48.
<https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-48>
15. *Lunenfeld B, Bilger W, Longobardi S, Alam V, D'Hooghe T, Sunkara SK* (2019) The Development of Gonadotropins for Clinical Use in the Treatment of Infertility. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 429.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00429>
16. *Lispi M, Humaidan P, Bousfield GR, D'Hooghe T, Ulloa-Aguirre A* (2023) Follicle-Stimulating Hormone Biological Products: Does Potency Predict Clinical Efficacy? *Int J Mol Sci* 24(10): 9020.
<https://doi.org/10.3390/ijms24109020>
17. *Behringer R, Gertsenstein M, Nagy KV, Nagy A* (2018) Administration of Gonadotropins for Superovulation in Mice. *Cold Spring Harb Protoc* 2018(1).
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot092403>. PMID: 29295897
18. *Mochida K* (2020) Development of assisted reproductive technologies in small animal species for their efficient preservation and production. *J Reprod Dev* 66(4): 299–306.
<https://doi.org/10.1262/jrd.2020-033>
19. *Kala M., Nivsarkar M* (2016) Role of cortisol and superoxide dismutase in psychological stress induced anovulation. *Gener Compar Endocrinol* 225: 117–124.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.010>
20. *Mariotti FFN, Gonçalves BSM, Pimpão G, Mônico-Neto M, Antunes HKM, Viana MB, Céspedes IC, Le Sueur-Maluf L* (2020) A single ovarian stimulation, as performed in assisted reproductive technologies, can modulate the anxiety-like behavior and neuronal activation in stress-related brain areas in rats. *Horm Behav* 124: 104805.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104805>
21. *Louis GM, Lum KJ, Sundaram R, Chen Z, Kim S, Lynch CD, Schisterman EF, Pyper C* (2011) Stress reduces conception probabilities across the fertile window: evidence in support of relaxation. *Fertil Steril* 95(7): 2184–2189.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.078>
22. *Retana-Márquez S, Juárez-Rojas L, Ávila-Quintero A, Rojas-Maya S, Perera G, Casillas F* (2020) Neuroendocrine disruption is associated to infertility in chronically stressed female rats. *Reprod Biol* 20(4): 474–483.
<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.011>
23. *Gao Y, Chen F, Kong QQ, Ning SF, Yuan HJ, Lian HY, Luo MJ, Tan JH* (2016) Stresses on Female Mice Impair Oocyte Developmental Potential: Effects of Stress Severity and Duration on Oocytes at the Growing Follicle Stage. *Reprod Sci* 23(9): 1148–1157.
<https://doi.org/10.1177/1933719116630416>
24. *Kim J, You S* (2022) High Housing Density-Induced Chronic Stress Diminishes Ovarian Reserve via Granulosa Cell Apoptosis by Angiotensin II Overexpression in Mice. *Int J Mol Sci* 23(15): 8614.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158614>
25. *Gądek-Michalska A, Tadeusz J, Bugajski A, Bugajski J* (2019) Chronic Isolation Stress Affects Subsequent Crowding Stress-Induced Brain Nitric Oxide Synthase (NOS) Isoforms and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis Responses. *Neurotox Res* 36(3): 523–539.
<https://doi.org/10.1007/s12640-019-00067-1>
26. *Caligioni CS* (2009) Assessing Reproductive Status/Stages In Mice. *Curr Protoc Neurosci* 48(1).
<https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48>
27. *Shindo M, Miyado K, Kang W, Fukami M, Miyado M* (2022) Efficient Superovulation and Egg Collection from Mice. *Bio Protoc* 12(11): e4439.
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4439>
28. *Sabry R, Nguyen M, Younes S, Favetta LA* (2022) BPA and its analogs increase oxidative stress levels in in vitro cultured granulosa cells by altering anti-oxidant enzymes expression. *Mol Cell Endocrinol* 545: 111574.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111574>
29. *Mirzayans R, Murray D* (2020) Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies? *Int J Mol Sci* 21(23): 9090.
<https://doi.org/10.3390/ijms21239090>
30. *Tsuji A, Ikeda Y, Murakami M, Kitagishi Y, Matsuda S* (2021) Leucine protects oocytes from chronic psychological stress in mice. *Reprod Med Biol* 20(4): 477–484.
<https://doi.org/10.1002/rmb2.12396>
31. *Wu LM, Hu MH, Tong XH, Han H, Shen N, Jin RT, Wang W, Zhou GX, He GP, Liu YS* (2012) Chronic Unpredictable Stress Decreases Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Mouse Ovaries: Relationship to Oocytes Developmental Potential. *PLoS One* 7(12): e52331.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052331>

32. Sun J, Guo Y, Zhang Q, Bu S, Li B, Wang Q, Lai D (2018) Chronic restraint stress disturbs meiotic resumption through APC/C-mediated cyclin B1 excessive degradation in mouse oocytes. *Cell Cycle* 17(13): 1591–1601.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1471316>
33. Casillas F, Flores-González A, Juárez-Rojas L, López A, Betancourt M, Casas E, Bahena I, Bonillac E (2023) Chronic stress decreases fertility parameters in female rats. *Systems Biol in Reprod Med* 69(3): 234–244.
<https://doi.org/10.1080/19396368.2023.2171822>
34. Gao L, Zhao F, Zhang Y, Wang W, Cao Q (2020) Diminished ovarian reserve induced by chronic unpredictable stress in C57BL/6 mice. *Gynecol Endocrinol* 36(1): 49–54.
<https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1631274>
35. Lee M, Ahn JI, Lee AR, Ko DW, Yang WS, Lee G, Ah JY, Lim JM (2017) Adverse Effect of Superovulation Treatment on Maturation, Function and Ultrastructural Integrity of Murine Oocytes. *Molec and Cells* 40(8): 558–566.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0058>
36. Wang Q, Zhao SX, He JN, Zhao H, Gu BX, Xie JK, Zhao YJ, Zhang CL, Ge ZJ (2022) Repeated Superovulation Accelerates Primordial Follicle Activation and Atresia. *Cells* 12(1): 92.
<https://doi.org/10.3390/cells12010092>
37. Zhang X, Wang L, Li X, Li K, Fang J, Yao Y (2010) Ovarian stimulation retards postimplantation development and alters global gene expression profile of blastocysts in mouse. *Fertil Steril* 93(8): 2770–2773.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.03.018>
38. Taher L, Israel S, Drexler HCA, Makalowski W, Suzuki Y, Fuellen G, Boiani M (2021) The proteome, not the transcriptome, predicts that oocyte superovulation affects embryonic phenotypes in mice. *Sci Rep* 11(1): 23731.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-03054-9>
39. Liang J, Gao Y, Feng Z, Zhang B, Na Z, Li D (2023) Reactive oxygen species and ovarian diseases: Antioxidant strategies. *Redox Biol* 62: 102659.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102659>
40. Hoque SAM, Umehara T, Kawai T, Shimada M (2021) Adverse effect of superoxide-induced mitochondrial damage in granulosa cells on follicular development in mouse ovaries. *Free Radic Biol Med* 163: 344–355.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.434>
41. Gong X, Shen L, Zhang H, Ai J, Gilchrist RB, Zhao Y (2023) CAPA-IVM improves the cytoplasmic quality of in vitro-matured oocytes from unstimulated mice. *Theriogenology* 212: 117–128.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.09.004>
42. Guo Y, Sun J, Bu S, Li B, Zhang Q, Wang Q, Lai D (2020) Melatonin protects against chronic stress-induced oxidative meiotic defects in mice MII oocytes by regulating SIRT1. *Cell Cycle* 19(13): 1677–1695.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1767403>
43. Chen RR, Wang J, Zhang M, Kong QQ, Sun GY, Jin CH, Luo MJ, Tan JH (2022) Restraint stress of female mice during oocyte development facilitates oocyte postovulatory aging. *Aging (Albany NY)* 14(22): 9186–9199.
<https://doi.org/10.18632/aging.204400>
44. Sun J, Guo Y, Fan Y, Wang Q, Zhang Q, Lai D (2021) Decreased expression of IDH1 by chronic unpredictable stress suppresses proliferation and accelerates senescence of granulosa cells through ROS activated MAPK signaling pathways. *Free Radic Biol Med* 169: 122–136.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.016>
45. Liang B, Wei DL, Cheng YN, Yuan HJ, Lin J, Cui XZ, Luo MJ, Tan JH (2013) Restraint stress impairs oocyte developmental potential in mice: role of CRH-induced apoptosis of ovarian cells. *Biol Reprod* 89(3): 64.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110619>
46. Li CY, Li ZB, Kong QQ, Han X, Xiao B, Li X, Chang ZL, Tan JH (2018) Restraint-induced corticotrophin-releasing hormone elevation triggers apoptosis of ovarian cells and impairs oocyte competence via activation of the Fas/FasL system. *Biol Reprod* 99(4): 828–837.
<https://doi.org/10.1093/biolre/iox091>
47. Yuan HJ, Han X, He N, Wang GL, Gong S, Lin J, Gao M, Tan JH (2016) Glucocorticoids impair oocyte developmental potential by triggering apoptosis of ovarian cells via activating the Fas system. *Sci Rep* 6: 24036.
<https://doi.org/10.1038/srep24036>
48. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B (2016) Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol* 6: 603–621.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>

49. Miller BG, Armstrong DT (1981) Effects of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on ovarian function, serum estradiol, and progesterone levels and early embryo development in immature rats. *Biol Reprod* 25: 261–271.
[https://doi: 10.1095/biolreprod25.2.261](https://doi.org/10.1095/biolreprod25.2.261)
50. Fayazi M, Beigi Boroujeni M, Salehnia M, Khansarinejad B (2014) Ovarian stimulation by exogenous gonadotropin decreases the implantation rate and expression of mouse blastocysts integrins. *Iran Biomed J* 18(1): 8–15.
[https://doi: 10.6091/ibj.1236.2013](https://doi.org/10.6091/ibj.1236.2013)

Effects of Ovarian Stimulation with Gonadotropins in the Conditions of Chronic Psychosocial Stress on the Quality of Murine Oocyte

**D.A. Lebedeva^a, T.N. Igonina^{a,*}, E. Yu. Brusentsev^a, N.A. Shavshaeva^{a,b},
and S. Ya. Amstislavsky^a**

^aFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

**e-mail: egik_00@mail.ru*

Chronic psychosocial stress may negatively affect the female reproductive system. Meanwhile, the effect of ovarian stimulation with gonadotropins during stress on the quality of oocytes remains poorly studied. The purpose of this work was to investigate the effects of chronic psychosocial stress on the quality of murine cumulus-oocyte complexes during natural estrus cycle, as well as during ovarian stimulation with exogenous gonadotropins; the latter is an important part of modern assisted reproductive technologies. The results of the study demonstrate that psychosocial stress does not affect the number of ovulating oocytes, but worsens their quality, i.e. reduces the percentage of mature oocytes. In addition, stressed mice exhibited the increased accumulation of reactive oxygen species in oocytes, which is accompanied by the enhanced rate of apoptosis in cumulus cells. Hormonal stimulation of the ovaries with gonadotropins alleviates the negative changes associated with the psychosocial stress, normalizing the level of reactive oxygen species in oocytes and reducing the rate of apoptosis in cumulus cells.

Keywords: chronic psychosocial stress, gonadotropins, cumulus-oocyte complexes, oxidative stress, apoptosis, mice

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ
ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ КРЫС
ПРИ ГИПОТЕРМИИ

© 2024 г. Р. А. Халилов¹, А. М. Джафарова^{1, *}, З. Г. Рабаданова¹, М. Б. Джафаров²

¹Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

²Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, Астрахань,
Россия

*E-mail: albina19764@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2024 г.

После доработки 03.05.2024 г.

Принята к публикации 07.05.2024 г.

Снижение температуры тела гомойотермных животных может вызвать состояние организма, называемое гипотермическим. Оно сопровождается развитием целого ряда патологических процессов, многие из которых связаны с дисфункцией митохондрий и развитием оксидативного стресса. В связи с широким внедрением гипотермии в медицинскую практику, вопрос о возможности регуляторного влияния на прооксидантно-антиоксидантный статус митохондрий при низких температурах тела остается актуальным. В последние годы широкую популярность в качестве терапевтических средств, обладающих антиоксидантным и мембранопротекторным воздействием, получили растительные полифенолы, в частности, диgidрогкверцетин (ДГК). В данной работе предпринято исследование эффектов ДГК на интенсивность оксидативного стресса в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии. Обнаружено, что курсовое (5 дней) пероральное введение ДГК в дозе 100 мг/кг существенно снижает уровни продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительную модификацию белков в митохондриях печени контрольных крыс, повышая содержание неферментативных компонентов тиол-дисульфидной антиоксидантной системы. ДГК эффективно защищает митохондрии печени от развития оксидативного стресса при гипотермии, о чем свидетельствует существенное снижение (в некоторых случаях и полная нормализация) уровней диеновых конъюгатов, малонового диальдегида, шиффовых оснований и карбонильных групп у группы животных, подвергшихся гипотермии на фоне предварительного введения этого полифенола. При этом ДГК существенно повышает уровни глутатиона и витамина Е, а также нормализует содержание тиоловых групп в митохондриальных белках. *In vitro* ДГК демонстрирует дозозависимый антиоксидантный эффект, подавляя и окислительную модификацию белков в митохондриях, инкубированных в среде Фентона ($IC_{50} = 0.160$ мг/мл).

Ключевые слова: гипотермия, крысы, митохондрии, оксидативный стресс, антиоксиданты, диgidрогкверцетин

ВВЕДЕНИЕ

Гипотермия – это состояние гомойотермного животного, при котором температура тела падает до уровня ниже, чем необходимо для поддержания функций организма. Снижение температуры может нарушить некоторые физиологические и биохимические процессы в организме, включая изменения в микроциркуляции крови и снижение поступления кислорода в ткани, нарушение митохондриального дыхания и синтеза АТФ. Падение температуры тела также влияет на различные ферментативные системы, на содержание в клетках воды и ионов натрия, калия и кальция [1].

Ключевую роль в патогенезе гипотермического состояния у гомойотермных животных играют активные формы кислорода (АФК) и азота [2]. Известно множество внутриклеточных источников АФК (эндоплазматический ретикулум, пероксисомы, митохондрии, НАДФН-оксидазы, NO-синтазы, моноамиоксидазы, митохондрии, липоксигеназы и др). Несмотря на то, что в норме общий вклад митохондрий в производство АФК в гепатоцитах не столь значителен ($\approx 15\%$) [3], они традиционно считаются основными источниками АФК при патологических состояниях организма, когда развивается митохондриальная дисфункция, резко повышающая уровни АФК.

АФК могут вызывать повреждение клеток при воздействии на ДНК, липидные мембраны, белки и ферменты, что приводит к нарушению их функциональной активности [4]. Показано существование не менее одиннадцати связанных с электрон-транспортной цепью источников АФК в митохондриях [3], из которых Комплексы I и III считаются основными [4]. Снижение уровня кислорода в тканях на начальных этапах гипотермии вызывает избыточную генерацию АФК, нарушение тиолового статуса белков и редокс-регуляции, что приводит к развитию оксидативного стресса [2, 5–7]. Это в свою очередь оказывает существенное влияние на структурно-динамическое состояние митохондриальных мембран и их ультраструктурную организацию, активность участников электрон-транспортной цепи и респираторные характеристики, способствует открытию неспецифической Ca^{2+} -индуцируемой митохондриальной поры (МРТР) и нарушению кальций-аккумулирующей способности митохондрий [8, 9]. Поскольку АФК могут играть ключевую роль в патогенезе гипотермических состояний, вопрос о возможности регуляторного воздействия на интенсивность оксидативного стресса в митохондриях гомойотермных животных при низких температурах тела остается актуальным.

Среди множества антистрессорных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами и оказывающих мембранопротекторное воздействие и при этом малотоксичных и безопасных для применения, особое место отводится полифенолам растительного происхождения. Являясь природными соединениями с одной или несколькими гидроксильными группами, присоединенными к бензольному кольцу, эти вещества способны обезвреживать свободные радикалы и тем самым защищать клетки от оксидативных повреждений [10].

К настоящему времени установлено, что ряд полифенолов оказывает положительное влияние на функции митохондрий. Так, исследование влияния природных полифенолов (ресвератрола, дигидромирицетина, пиносильвина, эпигаллокатехина, мирицетина и дигидрокверцетина (таксифолина, ДГК)) на скорость генерации АФК митохондриями печени крыс при развитии токсического повреждения печени показало, что все эти полифенолы *in vitro* в концентрации 10 мкМ оказывали антиоксидантное действие. При этом в условиях неспецифической Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации митохондриальной мембраны наиболее выраженное уменьшение скорости генерации перекиси водорода демонстрировали ДГК и мирицетин [11]. Учитывая обнаруженные ранее отрицательные эффекты гипотермии на структурно-функциональные характеристики митохондрий, обусловленные оксидативным стрессом и индукцией МРТР [9], в качестве потенциального кандидата в митохондриально-адресованные протекторы гипотермических повреждений можно предложить ДГК. Целью данной работы явилось исследование эффектов ДГК на интенсивность оксидативного стресса в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Опыты проводились на белых ненаркотизированных (аутбрендных) крысах Wistar массой 220–230 г, полученных из питомника «Столбовая» (Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России) и содержащихся в стандартных условиях вивария (средняя температура воздуха – 26 °С, влажность воздуха – 40–60%) Дагестанского государственного университета. Во избежание возрастных и суточных колебаний на результаты экспериментов, опыты проводили в одно и то же время дня (с 9 до 11 ч). Животных делили на 4 группы по 8 животных в каждой:

1. Контроль;
2. Курсовое (5 дней) введение ДГК;
3. Умеренная (30 °С) гипотермия;
4. Умеренная (30 °С) гипотермия на фоне предварительного курсового (5 дней) введения ДГК.

Постановка эксперимента и моделирование гипотермии

Контрольную группу представляли интактные животные. Для учета возможных эффектов ДГК крысам второй группы ежедневно в течение 5 дней однократно перорально вводили раствор ДГК из расчета 100 мг сухого вещества на кг массы тела. Введение осуществлялось с помощью специального зонда. На 6-й день животных декапитировали. У 3-й группы индуцировали кратковременную умеренную гипотермию. Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала холодная вода. Температуру тела крыс снижали равномерно со скоростью 0.28 °С/мин до 30 °С и пролонгировали это состояние в течение 1 ч. Температуру измеряли в прямой кишке на глубине 4–5 см ректальным цифровым термометром MS6501.

Выделение митохондрий

Выделение интактных митохондрий производили методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Все процедуры выполнялись на холоде при температуре 2–4 °С. Печень предварительно измельчали, пропускали через пресс и готовили 10%-ный гомогенат в среде выделения (0.25 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА, 0.1% BSA, pH = 7.4), после чего центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отделяли и центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин на центрифуге MR23i (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный дважды отмытый осадок доводили до 2 мл и суспендировали в 0.32 М сахарозе. Суспензию митохондрий насаивали на заранее приготовленный градиент плотности сахарозы (содержащий 3.5 мл 1.1 М сахарозы; 7.5 мл 0.8 М; 7.5 мл 0.5 М и 5 мл 0.3 М) и центрифугировали в бакетном роторе SW32 Ti при 7500 об/мин на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США). Все растворы сахарозы, использованные для создания градиента ее плотности в пробирке, были приготовлены на буфере 10 мМ HEPES, содержащем 1 мМ ЭДТА (pH 7.2) и 0.1% альбумина.

Митохондрии, находящиеся в слоях 0.5–0.8 М отсасывали специальным приспособлением для отбора фракций и осаждали при 15000 g на центрифуге MR23i (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный осадок промывали в среде промывки (0.25 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА, pH 7.4) и повторно центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин. Осадок митохондрий ресуспендировали в среде промывки и замораживали при температуре –70 °С.

Определение продуктов ПОЛ

Продукты ПОЛ экстрагировали из митохондрий смесью гептана и изопропанола. Полученные гептановые и изопропанольные экстракты сканировали на спектрофотометре Beckman DU-730 в области длин волн от 190 до 400 нм. Поглощение в области 232–240 нм соответствовало диеновым конъюгатам (ДК), а 362 нм – основаниям Шиффа (ШО).

Определение содержания малонового диальдегида (МДА)

Содержание МДА в митохондриях определяли по реакции его с тиобарбитуровой кислотой. Расчет производили с использованием коэффициента молярного поглощения $1.56 \cdot 10^5$ л/(моль·см) в нмолях на 1 мг белка.

Определение содержания карбонильных и сульфгидрильных групп

Содержание карбонильных групп в белках митохондрий определяли по реакции их с 2,4-динитрофенилгидразином [12]. Расчет производили с использованием коэффициента молярного поглощения 22000 л/(моль·см) в нмолях на 1 мг белка. Содержание SH-групп в белках митохондрий измеряли колориметрическим методом по реакции их с 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой. Концентрацию выражали в нмолях на 1 мг белка, используя для расчета коэффициент молярного поглощения 13600 л/(моль·см).

Определение содержания глутатиона (GSH) в митохондриях печени крыс

Содержание GSH в митохондриях определяли методом Элмана. Концентрацию выражали в нмолях на мг белка, рассчитывая ее с использованием коэффициента молярного поглощения 13600 л/(моль·см).

Определение содержания витамина E в митохондриях печени крыс

Для определения содержания витамина E производили предварительную подготовку проб, включающую омыление и экстрагирование. Оптическую плотность полученной пробы измеряли в диапазоне длин волн 250–350 нм. Максимум поглощения α -токоферола соответствует $\lambda = 292$. Концентрацию рассчитывали с использованием коэффициента молярного поглощения 75.8 л/(моль·см) и выражали в нмолях на 1 мг белка.

Определение антиоксидантной активности ДГК in vitro

Изолированные митохондрии предварительно инкубировали (в течение 15 мин) при 30 °C в 1 мл среды инкубации, содержащей различные концентрации ДГК (0.0125; 0.025; 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.8 мг/мл). Для контроля митохондрии инкубировали 15 мин в 1 мл среды инкубации без добавления ДГК. Для генерации АФК добавляли в каждую пробирку, содержащую митохондрии и ДГК, аскорбиновую кислоту (конечная концентрация 4 мМ), сульфат железа (5 мкМ) и перекись водорода (4 мМ). Через 15 мин из каждой пробирки отбирали аликвоту и определяли в ней содержание продуктов окислительной модификации белков – карбонильных групп.

Статистическая обработка данных

Обработка данных произведена с использованием пакетов прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., США) и SPSS Statistics 22 (IBM, США). Нормальность распределения определяли по критерию Шапиро–Уилка. Равенство дисперсий экспериментальных данных оценивали с помощью критериев Левеня и Уэлча. Для

множественных сравнений независимых групп использовали непараметрический дисперсионный анализ и критерий Краскела–Уоллиса (H-test). При обнаружении статистически значимых различий между группами проводили апостериорные сравнения с помощью критерия Манна–Уитни с новым критическим уровнем значимости, учитывающим количество сравниваемых групп. Данные в таблицах представлены в виде медианы с указанием нижнего и верхнего квартилей – Ме [Q1: Q3]. Для корреляционного анализа использовали критерий Спирмана.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ДГК на интенсивность ПОЛ и ОМБ в митохондриях печени крыс

Интенсивность ПОЛ в биосистеме можно оценить по содержанию в ней первичных (ДК, гидроперекиси), вторичных (кетодиены, сопряженные триены и МДА) и третичных (ШО) продуктов перекиссации.

Диеновые конъюгаты, являющиеся первичными продуктами ПОЛ, относятся к токсическим метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты. При свободнорадикальном окислении ненасыщенной жирной кислоты происходит отрыв водорода в α -положении по отношению к двойной связи, что приводит к перемещению этой двойной связи с образованием ДК. Из табл. 1 видно, что курсовое введение ДГК уменьшает уровень ДК на 26.8%; снижение температуры тела до 30 °С у животных сопровождается значительным (на 31.9%) их повышением.

Таблица 1. Влияние ДГК на содержание маркеров ПОЛ и ОМБ в митохондриях печени крыс при гипотермии (Ме [Q1: Q3])

Животные	ДК, нмоль/мг белка	МДА, нмоль/мг белка	ШО, нмоль/мг белка	Карбонильные группы, нмоль/мг белка
Контроль	38.5 [36.4:40.4]	0.41 [0.39:0.48]	1.56 [1.42:1.62]	8.2 [7.2:8.9]
ДГК	28.1 [22.8:28.6]*	0.19 [0.18:0.27]*	0.86 [0.74:0.98]*	4.0 [3.7:4.7]*
Гипотермия	50.8 [42.6:57.6]*	0.65 [0.59:0.82]*	2.29 [1.95:2.48]*	14.2 [12.9:15.5]*
ДГК+ гипотермия	39.55 [36.4:43.2]#+	0.49 [0.44:0.50]#+	1.34 [1.27:1.64]#+	10.9 [10:13]*#+

* $p < 0.05$ – относительно контроля, # – относительно гипотермии, + – относительно ДГК.

Однако предварительное введение ДГК в течение пяти дней снижает уровень ДК у гипотермизированных животных на 22.2%. Таким образом, ДГК может уменьшать интенсивность ПОЛ посредством снижения уровня первичных продуктов.

Вторичным продуктом перекиссации липидов является МДА – эндогенный альдегид, образующийся в результате метаболизма арахидоновой и других полиненасыщенных жирных кислот. Вследствие дальнейших биохимических превращений он окисляется до диоксида углерода или вступает во взаимодействие с фосфолипидами, аминокислотами и нуклеиновыми кислотами. Исследование содержания МДА в митохондриях печени крыс, представленное в табл. 1, свидетельствуют о том, что ДГК снижает уровень МДА на 53.7%. Снижение температуры тела до 30° повышает его на 41.5%. Предварительный курс ДГК способствует снижению содержания МДА на 24.5% по сравнению с гипотермией.

ШО являются результатом взаимодействия различных ПОЛ с аминокислотными остатками белков. Они образуются в результате обратимой реакции между карбонильной группой альдегида или кетона со свободной аминогруппой. Непрерывное накопление оснований Шиффа дестабилизирует мембраны и способствует деструкции клеток. Анализ содержания третичных продуктов ПОЛ – ШО в митохондриях печени крыс показал, что курсовое введение ДГК уменьшает содержание ШО на 44.9% (табл. 1). Гипотермия повышает уровень ШО у крыс, не получивших курс ДГК на 44%. Предварительное введение ДГК снижает уровень ШО у гипотермированных крыс на 41.5%.

АФК и продукты ПОЛ могут способствовать окислительной модификации митохондриальных белков. При этом окислению могут подвергаться остатки положительно заряженных аминокислот (лизина, аргинина и гистидина), а также остатки пролина с образованием карбонильных групп. Карбонилирование является необратимой формой модификации белка, поскольку в митохондриях нет ферментов, способных осуществить катализ обратной реакции.

Из табл. 1 видно, что введение ДГК уменьшает уровень образования карбонильных групп в белках митохондрий печени крыс на 51.3%. Умеренная гипотермия способствует значительному повышению (на 37%) уровня карбонильных групп. Предварительный курс ДГК у гипотермированных животных снижает уровень карбонильных групп относительно гипотермии на 23.3%.

Корреляционный анализ показал, что между различными параметрами ПОЛ и ОМБ обнаружены положительные корреляции: между карбонильными группами и ДК ($r=0.78$, $p < 0.05$), между МДА и карбонильными группами ($r=0.84$, $p < 0.05$).

Влияние ДГК на состояние антиоксидантной системы митохондрий печени крыс

Поскольку высокие уровни АФК способны необратимо повредить биологические структуры, клетки обладают множеством ферментативных и неферментативных антиоксидантных защитных механизмов, поддерживающих окислительно-восстановительный гомеостаз. К антиоксидантным ферментам относят различные изоформы супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), тиоредоксинредуктаза (Trx-R), тиоредоксин (Trx), пероксиредоксин, глутароредоксин, глутатион-S-трансфераза (GST). К неферментативным антиоксидантам – глутатион (GSH), витамины Е, А, С. Двумя основными антиоксидантами, защищающими клетку от АФК, являются GSH и коэнзим Q_{10} [13].

Исследование показало, что курсовый прием ДГК у интактных крыс существенно увеличивает уровень GSH (табл. 2). Умеренная гипотермия значительно (на 47.3%) снижает концентрацию GSH относительно контроля. При этом предварительный курс ДГК сохраняет содержание данного антиоксиданта на достаточно высоком уровне, превышающем на 62% таковой у гипотермированных крыс.

Таблица 2. Влияние ДГК на содержание неферментативных компонентов антиоксидантной системы в митохондриях печени крыс при гипотермии (Ме [Q1: Q3])

Животные	Тиоловые группы, нмоль/мг белка	GSH, нмоль/мг белка	Витамин Е, нмоль/мг белка
Контроль	76.2 [66.2:80.1]	5.5 [5.2:6.9]	3.8 [3.5:4.1]
ДГК	115.5 [98.3:120.4]*	11.5 [8.9:12.6]*	4.1 [3.8:4.8]
Гипотермия	39.3 [30.3:54.1]*	2.9 [2.4:3.2]*	2.3 [1.8:2.7]*
ДГК+гипотермия	66.2 [60.5:80.7]++	4.7 [3.8:4.7]++	3.2 [2.9:3.7]++

* $p < 0.05$ * – относительно контроля, # – относительно гипотермии, ++ – относительно ДГК.

Множество клеточных белков содержат в своем составе остатки цистеина очень чувствительных к АФК, поэтому тиоловые группы белков часто рассматривают в качестве маркеров ОМБ. При этом поверхностные цистеины белков действуют как «антиоксидантные ловушки» для АФК и являются важными элементами тиол-дисульфидной антиоксидантной системы.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что ДГК повышает уровень тиоловых групп в белках митохондрий на 51.3% (табл. 2). Умеренная кратковременная гипотермия снижает их содержание на 48.4% относительно контроля.

Предварительный курс ДГК нивелирует отрицательные эффекты гипотермии на содержание тиоловых групп. Уровень их повышается относительно гипотермии на 69.2%, однако остается ниже контрольных значений на 12%. Корреляционный анализ по Спирману показал, что между глутатионом и тиоловыми группами белков имеется высокая степень положительной корреляции (рис. 1) ($r = 0.88$, $p < 0.05$). Известно, что GSH поддерживает все тиоловые группы протеома в клетке, участвуя совместно с глутаредоксином (Grx) в реакциях тиол-дисульфидного обмена [14].

С системой глутатиона тесно связан важнейший антиоксидант биомембран, способствующий обрыву цепной реакции процесса ПОЛ – витамин Е (α -токоферол). Содержание витамина Е в митохондриях у крыс, получивших курс ДГК, не претерпевает изменений (табл. 2). Умеренная гипотермия снижает его уровень на 36.5% относительно контроля. Предварительный курс ДГК способствует повышению уровня витамина Е у гипотермированных крыс, однако полной его нормализации не происходит. Между содержанием витамина Е и глутатионом была обнаружена положительная корреляция умеренной силы ($r = 0.63$, $p < 0.05$).

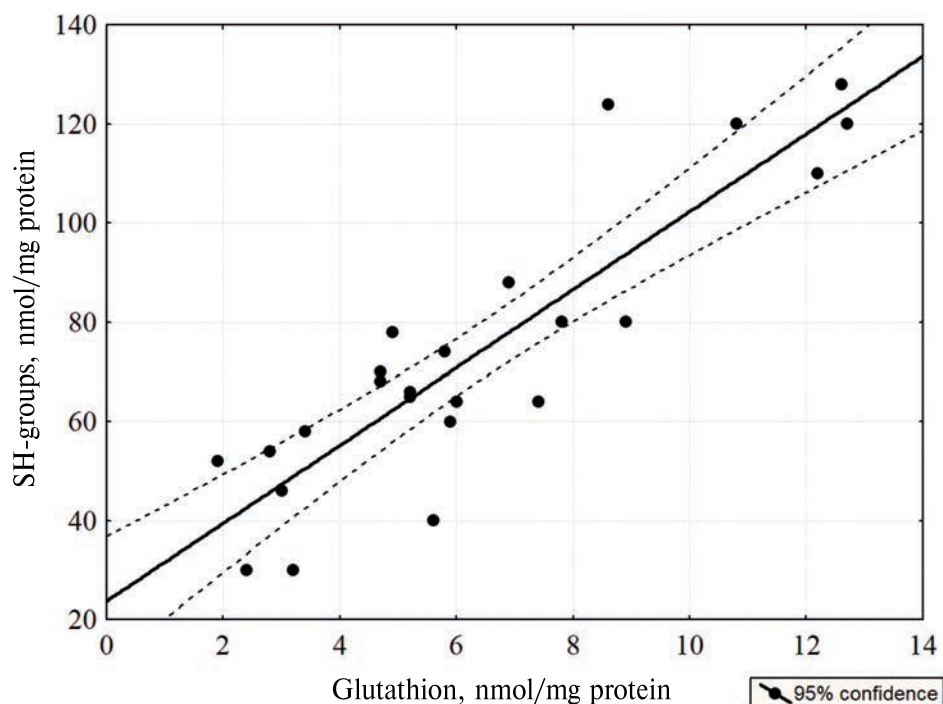


Рис. 1. Корреляционные связи между уровнем глутатиона и содержанием сульфгидрильных групп в белках митохондрий печени крыс при различных физиологических состояниях (контроль, курсовое ДГК, кратковременная гипотермия, умеренная гипотермия на фоне курсового введения ДГК). $r = 0.88$, $p < 0.05$.

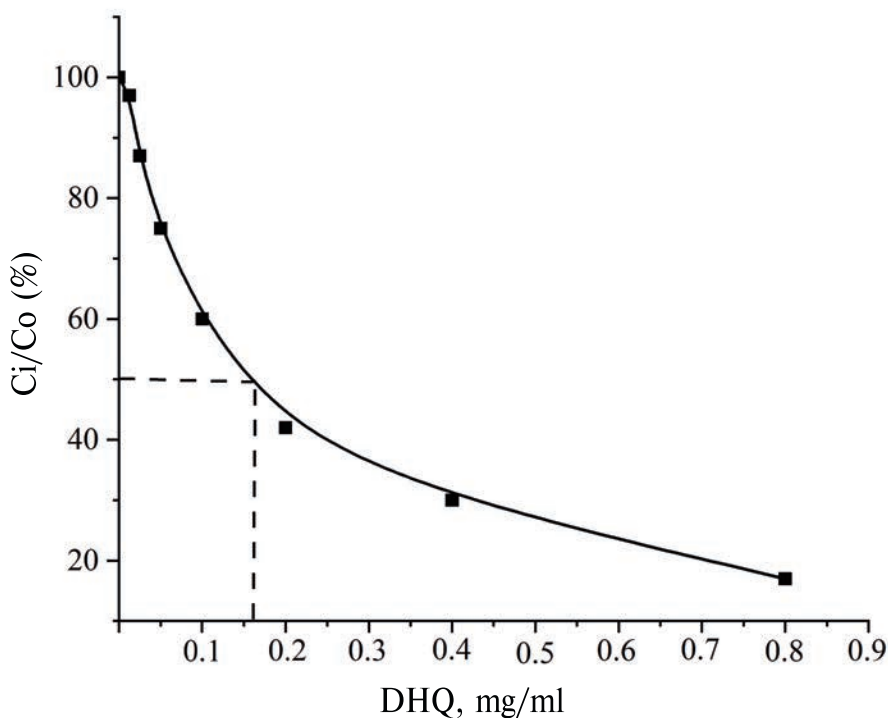


Рис. 2. Кинетическая кривая зависимости C_i/C_o (%) от концентрации ДГК (C_i – концентрация карбонильных групп при данной концентрации ДГК, C_o – это концентрация карбонильных групп в среде без ДГК). Пунктиром показана концентрация ДГК, вызывающая 50%-ное подавление (IC_{50}) интенсивности ОМБ при инкубации изолированных митохондрий в среде Фентона.

Таким образом, ДГК оказывает выраженное влияние на тиол-дисульфидную систему митохондрий, при этом уровень витамина Е меняется не существенно. Однако при гипотермии его курсовое введение предотвращает окисление витамина Е.

Для того чтобы оценить антиоксидантную активность различных веществ можно использовать метод, основанный на влиянии потенциальных антиоксидантов на интенсивность окислительных процессов в различных изолированных клеточных структурах, инкубированных в среде генерации АФК, в частности, в среде Фентона.

Результаты исследования влияния ДГК на содержание карбонильных групп в белках изолированных митохондрий, инкубированных в среде Фентона, представлены в виде кинетической кривой зависимости C_i/C_o (%) от концентрации ДГК на рис. 2.

Из рис. 2 видно, что ДГК дозозависимо подавляет образование карбонильных производных в аминокислотных остатках митохондриальных белков. Причем с повышением концентрации ДГК доля карбонильных групп в белках митохондрий печени крыс значительно снижается. Мы определили значение IC_{50} (концентрацию вещества, при которой происходит 50%-ное ингибирование процесса окисления белков). IC_{50} равна 0.160 мг/мл, то есть при данной концентрации ДГК происходят 50%-ное ингибирование процессов окислительной модификации белков митохондрий, инкубированных в среде Фентона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Умеренная гипотермия возникает вследствие нарушения регуляторных механизмов в условиях длительного воздействия низкой температуры. На начальных этапах гипотермия способствует развитию ряда реакций, связанных с функциональной активностью гипоталамуса и направленных либо на снижение потери тепла, либо на повышение теплопродукции [15].

Активация гипоталамуса инициирует гипоталамо-гипофизарно-адреналовые системы. В результате этого в крови повышается уровень катехоламинов и кортикостероидов. Эти стрессорные гормоны являются основной причиной множества реакций, направленных как на сохранение тепла, так и на его продукцию [16].

Увеличение теплопродукции может происходить за счет сократительного и несократительного термогенеза. Сократительный термогенез связан с активным сокращением скелетных мышц, сопровождающийся интенсивной дрожью, учащенным дыханием и сердцебиением, высокой скоростью обмена веществ и увеличением потребления кислорода. Несократительный термогенез обусловлен продукцией тепла за счет интенсификации окислительных процессов, повышением потребления кислорода митохондриями и снижением эффективности окислительного фосфорилирования. Ранее нами было обнаружено, что начальные этапы гипотермии и ее пролонгирование в течение 1 ч значительно повышают скорости потребления кислорода в митохондриях печени крыс при всех метаболических состояниях митохондрий. При этом существенно снижается коэффициент окислительного фосфорилирования и дыхательный контроль [8].

Наряду с процессами, направленными на производство тепла, в организме гомойотермных животных при гипотермии происходят процессы, связанные с уменьшением теплоотдачи. Известно, что начальные этапы гипотермии сопровождаются спазмом сосудов и централизацией кровотока, увеличением вязкости крови [1]. Падение минутного объема крови, нарушение микроциркуляции и резкий сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево [5] могут снизить доставку кислорода к тканям и приводить к развитию гипоксии. Гипоксия на фоне интенсивных окислительных процессов увеличивает уровень восстановленности комплексов I и III электрон-транспортной цепи митохондрий. Известно, что именно эти комплексы ответственны, главным образом, за генерацию супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$) [4].

Супероксид представляет собой умеренно реакционноспособный радикал, который можно считать «первичным» окислителем. Его генерация может привести к образованию более сильных окислителей – гидроксильного радикала ($OH^{\cdot}$), перекиси водорода (H_2O_2), пероксинитрита. Супероксид может подвергаться дисмутации, катализируемой СОД, с образованием перекиси водорода. В присутствии восстановленных переходных металлов (например, Fe^{2+} или Cu^+) перекись водорода может превращаться в гидроксильный радикал (реакция Фентона). Гидроксильный радикал обладает высокой неизбирательной реакционной способностью, коротким периодом полураспада *in vivo* (10^{-9} с) и незначительным эффективным радиусом действия (около 30 ангстрем). Он окисляет большинство органических молекул со скоростью, ограниченной диффузией [17]. H_2O_2 обладает меньшей активностью по сравнению с гидроксильным радикалом, однако она более стабильна (период полураспада около 1 мс) и может диффундировать далеко от своего источника.

Известно, что основными мишенями H_2O_2 являются тиоловые группы остатков цистеина, окисление которых приводит к образованию нескольких различных продуктов, в том числе производных сульфеновой кислоты, которые впоследствии могут подвергаться дальнейшему окислению до сульфиновой и сульфоновой кислоты. Кроме того, они могут образовывать дисульфидные связи с близлежащими цистеинами ($-SS-$) и трансформироваться в несколько аддуктов при реакции с $NO^{\cdot}$ (S-нитрозилирование)

или GSH (S-глутатиолирование). Окислительные модификации тиоловых групп приводят к изменениям в структуре и функции белка, что может изменить активность фермента, если критический цистеин расположен внутри его каталитического домена [17].

Разложение H_2O_2 катализируется гем-зависимой каталазой, селен-зависимой ГП и тиолсодержащим пероксиредоксином. В ходе детоксикации H_2O_2 селенол ГП окисляется и впоследствии повторно восстанавливается за счет двух молекул GSH, в результате чего образуется окисленный глутатион (GSSG), который восстанавливается ГР. Пероксиредоксин окисляется по своим функциональным цистеинам при удалении H_2O_2 , образуя сульфеновую кислоту или внутримолекулярный дисульфид. Оба могут быть восстановлены Trx в сочетании с НАДФН-зависимой TrxR [18].

В условиях гипоксии уровни АФК в клетке могут значительно превысить содержание и активность антиоксидантных систем. Множество научных работ подтверждают, что гипотермические состояния повышают уровни АФК, что на фоне истощения компонентов антиоксидантной системы способствует развитию оксидативного стресса [2, 5, 6, 7]. Результаты данного исследования также демонстрируют интенсификацию оксидативных процессов в митохондриях печени крыс при пролонгированной однократной умеренной гипотермии, о чем свидетельствуют высокие уровни продуктов ПОЛ и ОМБ. При этом происходит значительное снижение уровня GSH, что приводит к нарушению тиолового редокс-статуса белков митохондрий. Учитывая то, что GSH и редокс-состояние тиоловых групп играют важную роль в регуляции активности комплексов ЭТЦ и ферментов цикла Кребса, а также состояния МРТР [19], истощение пула GSH может стать ключевым событием в развитии митохондриальной дисфункции.

Оксидативный стресс можно уменьшить тремя способами: во-первых, путем уменьшения воздействия, во-вторых, за счет увеличения количества антиоксидантов как эндогенно, так и экзогенно, и, наконец, за счет модуляции функциональной активности митохондрий. Соединения с антиоксидантной активностью могут рассматриваться как перспективные универсальные средства, способствующие профилактике и лечению состояний, вызванных окислительным стрессом. Одними из потенциальных фармакологических агентов являются полифенольные соединения растений. Полифенольные соединения имеют очень широкий спектр действия на биологические объекты, проявляя антиоксидантный, гепатопротекторный, антигипоксический, мембранотропный и многие другие эффекты [20].

Результаты нашего исследования указывают на то, что курсовое потребление полифенольного соединения – ДГК снижает интенсивность оксидативных процессов как в норме, так и при гипотермии, повышает уровень компонентов тиол-дисульфидной системы. Вероятно, он обладает прямым антиоксидантным эффектом, о чем свидетельствует существенное ингибирование *in vitro* процесса окислительной модификации белков изолированных митохондрий, инкубированных в среде Фентона. Интересно то, что эффекты ДГК на различные продукты ПОЛ и ОМБ достаточно схожи (снижение всех продуктов оксидативного стресса колеблется в пределах 40–55%). Возможно, что ДГК действует одним определенным механизмом, направленным на снижение интенсивности оксидативного стресса путем нейтрализации АФК, либо посредством модуляции активности комплексов ЭТЦ и структуры МРТР.

ДГК (таксифолин) состоит из двух фенильных групп А- и В-кольца, которые соединены гетероциклическим кольцом (С-кольцом). Сложная структура придает таксифолину разнообразные фармакологические активности, наиболее фундаментальными среди которых являются антиоксидантные и противовоспалительные свойства [21]. Известно, что ДГК обладает множеством биологических свойств: препятствует повреждению мембран и развитию воспаления, ускоряет преобразование глюкозы в гликоген, повышает сопротивляемость организма к инфекциям и выносливость, улучшает функционирование сердечно-сосудистой системы. Его введение животным оказывает гепатопротекторные, противоопухолевые, нейропротекторные воздействия [21, 22].

Несмотря на такое разнообразие биологических эффектов ДГК, механизмы его влияния тесно связаны с его антиоксидантными свойствами. Антиоксидантная способность ДГК обусловлена его фенольными гидроксильными группами. Группы 5-ОН и 7-ОН, присутствующие в А- и С-кольцах позволяет ДГК проявлять мощный эффект по нейтрализации свободных радикалов [21]. ДГК показал выраженный антиоксидантный эффект *in vivo* при гепатите, индуцированном тетрахлорметаном [22]. Благодаря своей антиоксидантной активности, он демонстрировал нейропротекторный эффект, ингибируя окислительные повреждения нейронов в клетках коры головного мозга крыс [22].

Механизм ингибирования окислительных процессов, в том числе ПОЛ, в присутствии ДГК может быть различным. Обнаружено, что ДГК является эффективным поглотителем гидроксильных радикалов, который может защищать мезенхимальные клетки костномозгового происхождения (bmMSC) от повреждений, вызванных ОН $\cdot$. Кроме того, ДГК достаточно эффективен в удалении других радикалов и снижении уровня Fe $^{3+}$ [21]. Он может ингибировать окислительный стресс и апоптоз эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и клеток THP-1, индуцированный Cr(VI) [23].

В другом исследовании у крыс, получавших таксифолин, наблюдалось снижение перекисного окисления липидов в печени и сыворотке за счет реакции с тиобарбитуровой кислотой, что раскрывает антиоксидантные свойства таксифолина. Антиоксидантная активность таксифолина также проявляется через его нейропротекторное действие посредством ингибирования окислительных повреждений нейронов в кортикальных клетках крыс, что подтверждается его активностью по улавливанию радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) и ингибированию ПОЛ [24].

Таким образом, обнаруженные в данной работе положительные эффекты ДГК на редокс-состояние митохондрий печени крыс при гипотермии, а также множественные литературные данные о протекторных свойствах данного полифенола свидетельствуют о возможности его применения в качестве безопасного и эффективного средства предотвращения развития митохондриальной дисфункции при гипотермии.

Следует обратить особое внимание на тот факт, что ДГК существенно снижает уровень окислительных процессов и повышает содержание GSH и тиоловых групп в белках митохондрий у нормотермических крыс, то есть смещает равновесие между АФК и антиоксидантами в пользу последних. Такое смещение в соответствии с последними литературными данными может способствовать развитию так называемого «антиоксидативного стресса», приводящего к дисрегуляции множества клеточных функций [17].

Доказано, что множественные системы, генерирующие и элиминирующие АФК, активно поддерживают внутриклеточный окислительно-восстановительный баланс. АФК, в частности, перекись водорода, способны обратимо окислять важные, редокс-чувствительные остатки цистеина на белках-мишенях. Эти окислительные посттрансляционные модификации могут контролировать биологическую активность многочисленных ферментов и транскрипционных факторов, а также их клеточную локализацию или взаимодействие с лигандами [18]. Оказалось, что в низких концентрациях АФК играют важную роль регуляторных медиаторов и участвуют в процессах передачи сигналов и адаптации [17]. В связи с этим вопрос о целесообразности применения антиоксидантов в условиях нормы, когда уровни АФК находятся в пределах физиологических концентраций, все еще остается открытым и требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предварительный пятидневный курс ДГК в дозе 100 мг/кг снижает интенсивность окислительного стресса в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии. Об этом свидетельствует существенное снижение в них содержания продуктов перекисидации липидов (ДК, МДА и ШО) и окислительной деструкции белков (карбонильных

групп). При этом ДГК повышает антиоксидантный потенциал митохондрий гипотермированных животных, способствуя поддержанию в условиях низкотемпературного стресса достаточно высоких уровней неферментативных антиоксидантов (глутатиона и витамина Е). ДГК проявляет выраженные антиоксидантные свойства не только *in vivo*, но и *in vitro*, ингибируя процессы окислительной модификации белков митохондрий в среде Фентона, генерирующей АФК. Обнаруженные антиоксидантные свойства ДГК, вероятнее всего, связаны с его способностью нейтрализовать АФК, выступая в качестве их скавенджера. ДГК не приводит к полной нормализации маркеров оксидативного стресса при гипотермии несмотря на то, что у контрольных животных он демонстрирует более выраженный по сравнению с гипотермированными животными антиоксидантный эффект. Полученные в работе данные могут быть использованы для разработки новых терапевтических стратегий и фармакологических препаратов направленного действия в целях предотвращения нарушений митохондриальных функций при гипотермических состояниях у человека.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Р. А. Х. – постановка проблемы, разработка концепции статьи и дизайн исследования; А. М. Д. – получение экспериментальных данных, описание результатов; З. Г. Р. – критический анализ литературы и формирование выводов исследования; М. Б. Д. – статистическая обработка экспериментальных данных и их интерпретация.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Дагестанского государственного университета. 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 Дагестанского государственного университета, протокол №2 от 5.02.2024 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Polderman KH* (2009) Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical Care Med* 37 (7): 186–202.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181aa5241>
2. *Alva N, Palomeque J, Teresa C* (2013) Oxidative stress and antioxidant activity in hypothermia and rewarming: can RONS modulate the beneficial effects of therapeutic hypothermia. *Oxidative Med. Cel. Longevity*. Article ID957054: 10.
<https://doi.org/10.1155/2013/957054>
3. *Konno T* (2021) Intracellular Sources of ROS/H2O2 in health and Neurodegeneration: Spotlight on Endoplasmic Reticulum. *Cells* 10(2): 233.
<https://doi.org/10.3390/cells10020233>
4. *Hernansanz-Agustín P* (2021) Generation of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. *Antioxidants* 10: 415.

5. *Zinchuk VV, Hlutkin SV* (2015) Blood oxygen transport and prooxidant-antioxidant balance in rats under hypothermia and rewarming combined with modification of L-arginine-NO pathway. *Asian J Pharmacy Nursing Med Sci* 3(2): 55–63.
6. *Халилов РА, Джафарова АМ, Хизриева СИ, Абдуллаев ВР* (2019) Интенсивность свободно – радикальных процессов в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности. *Цитология* 91(7): 1–12. [*Khalilov RA, Dzhaifarova AM, Khizrieva SI, Abdullaev VR* (2019) The intensity of free radical processes in rat liver mitochondria under moderate hypothermia of various durations. *Cytology* 91(7): 1–12. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S1990519X1906004X>
7. *Klichkhanov NK, Dzhaifarova AM* (2021) The Blood Prooxidant-Antioxidant Balance and Osmotic Fragility of Red Blood Cells Depend on the Duration of Moderate. In: *Advances in Health and Disease*: 31. Ed. Lowell T. Duncan. New York: Nova Sci Publ: 261.
8. *Халилов РА, Хизриева СИ, Джафарова АМ, Абдуллаев ВР* (2020) Респираторные характеристики митохондрий печени крыс зависят от длительности умеренной гипотермии. *Бюл эксп биол мед* 169(1): 33–38. [*Khalilov RA, Khizrieva SI, Dzhaifarova AM, Abdullaev VR* (2020) Respiratory characteristics of rat liver mitochondria depend on the duration of moderate hypothermia. *Bull Exp Biol Med* 169(1): 33–38. (In Russ)].
<https://rucont.ru/efd/712358>
9. *Хизриева СИ, Халилов РА, Джафарова АМ, Абдуллаев ВР* (2023) Кальций-аккумулирующая способность митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности. *Журн эвол биохим физиол* 59(4): 311–319. [*Khizrieva SI, Khalilov RA, Dzhaifarova AM, Abdullaev VR* (2023) Calcium Accumulating Ability of Rat Liver Mitochondria in Hypothermia of Various Duration. *J Evol Biochem Physiol* 59(4): 311–319. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0044452923040046>
10. *Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás – Barberán FA* (2019) The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct* 10(2): 514–528.
<https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>
11. *Дергачева ДИ, Кляйн О И, Мариничев АА, Гесслер НН, Теплова ВВ, Исакова ЕП, Дерябина ЮИ* (2020) Антиоксидантное действие природных полифенолов на митохондрии печени крыс с токсическим гепатитом. *Биол мембр* 37(3): 197–207. [*Dergacheva DI, Klein OI, Marinichev AA, Gessler NN, Teplova VV, Isakova EP, Deryabina YI* (2020) Antioxidant effect of natural polyphenols on liver mitochondria of rats with toxic hepatitis. *Biol Membr* 37(3): 197–207. (In Russ)].
12. *Venditti P, Rosa RD, Meo SD* (2004) Effect of cold – induced hyperthyroidism on H2O2 production and susceptibility of stress conditions of rat liver mitochondria. *Free Rad Biol Med* 36(3): 348–358.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.012>
13. *Enns G M* (2017) Glutathione as a redox biomarker in mitochondrial disease-implications for therapy. *J Clin Med* 6(5): 50.
<https://doi.org/10.3390/jcm6050050>
14. *Jones DP, Go YM* (2010) Redox compartmentalization and cellular stress. *Diabetes Obes Metab* 2: 116–125.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01266.x>
15. *Кулинский ВИ, Ольховский ИА* (1992) Две адаптационные стратегии в неблагоприятных условиях – резистентная и толерантная. Роль гормонов и рецепторов. *Успехи совр биол* 112(56): 697–714. [*Kulinsky VI, Olkhovsky IA* (1992) Two adaptation strategies in unfavorable conditions – resistant and tolerant. The role of hormones and receptors. *Success modern times biol* 112(56): 697–714. (In Russ)].
16. *Маяхи МТД, Кличханов НК* (2012) Влияние даларгина на содержание гормонов гипофизарно – надпочечникового и гипофизарно – тиреоидного эндокринного комплексов в крови крыс при гипотермии. *Изв Самарск научн центра РАН* 14: 273–277. [*Mayakhi MTD, Klichkhanov NK* (2012) The effect of dalarгин on the content of hormones of the pituitary – adrenal and pituitary – thyroid endocrine complexes in the blood of rats during hypothermia. *Proc Samara Scient Center Russ Acad Sci* 14: 273–277. (In Russ)].
17. *Meo SD, Venditti P* (2020) Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Med Cell Longev*, ID9829176: 32.
<https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
18. *Lennicke C, Cochemé HM* (2021) Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell* 81(18): 3691–3707.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.018>. PMID: 34547234
19. *Calabrese G, Morgan B, Riemer J* (2017) Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions. *Antioxid Redox Signal* 27(15): 1162–1177.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7121>

20. Бобрышева ТН, Анисимов ГС, Золоторева МС, Бобрышев ДВ, Будкевич РО, Москалев АА (2023) Полифенолы как перспективные биологически активные соединения. *Вопр питания* 92(1): 92–107. [Bobrysheva TN, Anisimov GS, Zolotoreva MS, Bobryshev DV, Budkevich RO, Moskalev AA (2023) Polyphenols as promising biologically active compounds. *Nutrit Issues* 92(1): 92–107. (In Russ)].
21. Liu Y, Shi X, Tian Y, Zhai S, Liu Y, Xiong Z, Chu S (2023) An insight into novel therapeutic potentials of taxifolin. *Front Pharmacol* 14: 1173855.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1173855>
22. Sunil C, Xu B (2019) An insight into the health – promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry* 166: 112066.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112066>
23. Cao X, Bi R, Hao J, Wang S, Huo Y, Demoz RM, Banda R, Tian S, Xin C, Fu M, Pi J, Liu J (2020) A study on the protective effects of taxifolin on human umbilical vein endothelial cells and THP-1 cells damaged by hexavalent chromium: a probable mechanism for preventing cardiovascular disease induced by heavy metals. *Food Funct* 11(5): 3851–3859.
<https://doi.org/10.1039/d0fo00567c>
24. Das A, Baidya R, Chakraborty T, Samanta AK, Roy S (2021) Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 142: 112004.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha>

Effects of Dihydroquercetin on the Intensity of Oxidative Stress in Rat Liver Mitochondria at Hypothermia

R.A. Khalilov^a, A.M. Dzhaferova^a, Z. G Rabadanova^{a,*}, and M.B. Dzhaferov^b

^aDagestan State University, Makhachkala, Russia

^bAstrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

*e-mail: albina19764@mail.ru

A decrease in body temperature in homeothermic animals can cause a state of the body called hypothermic. It is accompanied by the development of a number of pathological processes, many of which are associated with mitochondrial dysfunction and the development of oxidative stress. In connection with the widespread introduction of hypothermia into medical practice, the question of the possibility of a regulatory influence on the prooxidant-antioxidant status of mitochondria at low body temperatures remains relevant. In recent years, plant polyphenols, in particular dihydroquercetin (DHQ), have gained wide popularity as therapeutic agents with antioxidant and membrane protective effects. In this work, we investigated the effects of DHQ on the intensity of oxidative stress in rat liver mitochondria under moderate hypothermia. It was found that a course (5 days) oral administration of DHA at a dose of 100 mg/kg significantly reduces the levels of LPO and OMP products in the liver mitochondria of control rats, increasing the content of non-enzymatic components of the thiol-disulfide antioxidant system's. DHQ effectively protects liver mitochondria from the development of oxidative stress during hypothermia, as evidenced by a significant decrease (and in some cases, complete normalization) in the levels of diene conjugates, MDA, Schiff bases and carbonyl groups in a group of animals subjected to hypothermia with prior administration of this polyphenol. At the same time, DHQ significantly increases the levels of glutathione and vitamin E, and also normalizes the content of thiol groups in mitochondrial proteins. In vitro, DHQ exhibits a dose-dependent antioxidant effect, suppressing OMB in mitochondria incubated in Fenton's medium (IC50 = 0.160 mg/ml).

Keywords: hypothermia, rats, mitochondria, oxidative stress, antioxidants, dihydroquercetin

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННОЙ СТРУКТУРЫ
МЫШЕЧНЫХ СИНЕРГИЙ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОФИЛИРУЮЩИХ
ЭЛЕМЕНТОВ В ХУДОЖЕСТВЕННОЙ ГИМНАСТИКЕ**

© 2024 г. С. А. Моисеев¹ *, С. М. Иванов¹

*¹Великолукская государственная академия физической культуры и спорта, г. Великие Луки,
Россия*

** E-mail: sergey_moiseev@vlgafc.ru*

Поступила в редакцию 20.03.2024 г.

После доработки 14.05.2024 г.

Принята к публикации 14.05.2024 г.

В статье представлен анализ мышечных синергий, задействуемых при выполнении бросков мяча в различных направлениях и из разных исходных положений. В исследовании приняли участие 6 спортсменов высокой спортивной квалификации, занимающихся художественной гимнастикой. Во время движений синхронно регистрировали электромиограммы поверхностных мышц верхних конечностей и туловища, а также осуществляли видеозахват движений сегментов тела. Из зарегистрированных сигналов извлекали параметры синергий с помощью факторного анализа по методу главных компонент. Установлено, что лица, овладевшие сложным двигательным навыком, могут демонстрировать схожие стратегии двигательного контроля. Это проявляется в структурировании межмышечного взаимодействия в виде двух общих модулей, степень вовлечения мышц в которые оказывается в высокой степени схожей при реализации разных двигательных задач. Первый мышечный модуль реализует активное перемещение верхней конечности путем совместной активации мышц предплечья, плеча и верхнего плечевого пояса, а также обеспечивает стабилизацию положения туловища посредством синхронизации активности мышц спины и живота. Второй мышечный модуль специфичный и связан, преимущественно, с высоким вовлечением в синергию мышц верхнего плечевого пояса и предплечья при реализации упражнений, выполняемых без зрительного контроля, либо из исходных положений, ограничивающих подвижность определенных звеньев тела. Таким образом, решение проблемы координации множества элементов двигательной системы может заключаться не только в снижении количества исполнительных органов – мышц, задействованных в управлении, но и в организации переменных контроля в виде модулей на кинематическом уровне и их стабилизации посредством мышечных синергий.

Ключевые слова: мышечные синергии, кинематические модули, факторизация данных, двигательный контроль, художественная гимнастика

DOI: 10.31857/S0869813924060066, **EDN:** BEQPZY

ВВЕДЕНИЕ

Одним из способов преодоления сложности многосуставного и многмышечного управления движениями является организация элементов управляемой системы в модули и управление такими образованиями посредством центральных управляющих сигналов [1]. Понятие модульности исходит из предположения о том, что нейрональные сети разных уровней ЦНС могут подразделяться на дискретные единицы низкой размерности, способные выполнять простые операции по обработке информации. Например, на уровне спинного мозга такие единицы могут рассматриваться как минимальная структура, содержащая программу координированных действий конечности при ходьбе. Модули, организованные на мышечном уровне, определяемые как скоординированная активация мышечных групп с определенным балансом амплитуд и формой паттерна активации принято называть мышечными синергиями. Доказательства модульной архитектуры построения движений получены при рассмотрении широкого спектра произвольных движений на основе анализа параметров пространственной и временной их организации с применением различных алгоритмов факторизации [2–4].

Сегодня не вызывает сомнений факт наличия низкоразмерных модулей в системе управления мышечной активностью человека, однако, организация их задействования в процессе реализации разнообразных двигательных задач во многом остается не ясна. Большой пробел в знаниях об организации синергетического взаимодействия элементов двигательной системы отмечается при рассмотрении сложных моделей межмышечной координации в структуре многосуставных движений. Такие сведения представляют интерес не только для получения фундаментальных знаний о механизмах управления движениями, но и в практическом аспекте совершенствования двигательных навыков в трудовой и спортивной деятельности. Многие движения в сфере спорта являются специфичными, т.е. выученными и не характерными для повседневной двигательной деятельности человека. Например, профилирующие движения, относящиеся к категории базовых элементов в художественной гимнастике, имеют схожую биомеханическую структуру и являются устойчивым двигательным навыком. К движениям такого типа предъявляются повышенные требования, поскольку их точность является оцениваемым критерием и во многом определяет результативность выступления, соответственно характер межмышечного взаимодействия и наблюдаемые синергетические эффекты на разных уровнях построения синергий должны иметь свою специфику. Если управляющая система задействует небольшое число существующих мышечных модулей, гибко модулируя их основные характеристики в соответствии с условиями двигательной задачи, логично ожидать структурирования мышечной активности в инвариантное количество модулей. Вероятно, специфика управления такими движениями должна быть отражена в характере взаимодействия отдельных мышц в структуре синергетических модулей и их взаимодействии в ходе реализации двигательной задачи.

Целью работы явилось выяснение возможности построения разных по биомеханической структуре движений на основе единых синергетических модулей. Конкретная задача исследования включала определение степени сходства параметров пространственно-временной структуры синергий, организованных на мышечном и кинематическом уровне в процессе реализации профилирующих элементов в художественной гимнастике.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях приняли участие 6 спортсменок высокой квалификации, занимающихся художественной гимнастикой. Все испытуемые сообщали о правой ведущей руке. Они выполняли серию упражнений (бросков мяча) из исходного положения

«основная стойка»: вперед правой рукой, вперед левой рукой, вперед двумя руками, правой рукой в сторону, правой рукой назад, правой рукой из-за спины вперед. Кроме того, выполняли бросок вперед правой рукой из исходного положения стоя на коленях и из седа. Каждый бросок выполнялся по двенадцать раз, перерыв между сериями бросков составлял не менее 5 мин. Граничные периоды движений анализировались в системе 3D и определялись началом перемещения шиловидной антропометрической точки бросающей мяч руки, а также моментом ее остановки в исходном положении.

Для регистрации перемещений и величин суставных углов применяли систему Qualisys (Швеция) с частотой оцифровки 500 Гц. Светоотражающие маркеры прикрепляли к основным антропометрическим точкам сегментов тела, соответствующим осям вращения в суставах. Регистрировали динамику величин следующих суставных углов обеих сторон тела: шейного (CERV), плечевого (SHLD), локтевого (ULNR), тазобедренного (HIP), коленного (KNEE) и голеностопного (ANKLE). К этим данным применяли процедуру аппроксимизации кривой 2-й степени.

Во время выполнения движений билатерально регистрировали электромиограммы (ЭМГ) шестнадцати поверхностных мышц: локтевого разгибателя запястья (ECU), лучевого сгибателя запястья (FCR), трехглавой плеча (TRIC), двуглавой плеча (BIC), передних пучков дельтовидной (DELTA), верхних пучков трапециевидной (TRAPS), широчайшей спины (LATD), прямой живота (RA). Запись ЭМГ осуществлялась биомонитором ME6000 (Финляндия) с частотой опроса 2000 Гц. Активный электрод располагали в области двигательной точки мышцы, а референтный по ходу волокон на расстоянии 2 см, дополнительный электрод заземления располагали на том же расстоянии за референтным. ЭМГ фильтровали полосовым фильтром 30–450 Гц, усредняли в интервалах 0.002 с и повторно фильтровали фильтром низких частот 15 Гц. Сопряжение работы биомонитора с системой Qualisys осуществлялась через штатный канал синхронизации.

Методика определения структуры синергий. Данные о величинах суставных углов и ЭМГ экспортировались в Statistica (StatSoft, Inc., version 10), где формировали матрицу, состоящую из вариационных рядов регистрируемых величин и дополнительными переменными, идентифицирующими принадлежность измерений к различным испытуемым, попыткам, упражнениям и пр.[5]. Разложение матриц осуществляли с помощью факторного анализа по методу главных компонент без вращения факторов. Схема разложения данных в матрице представлена на рис. 1.

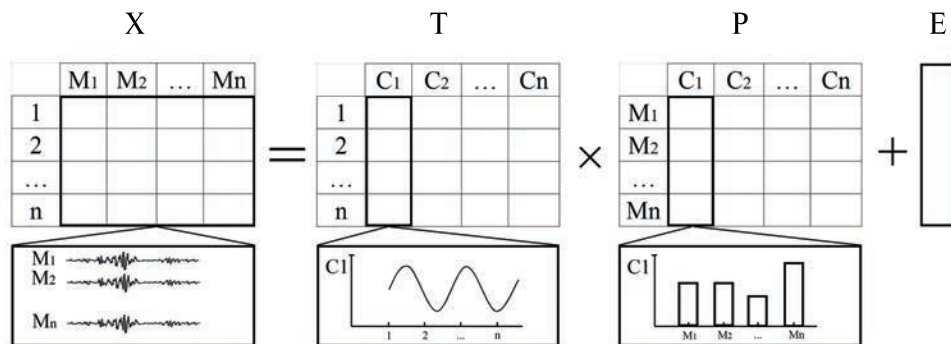


Рис. 1. Схема разложения матрицы данных на компоненты и выделения пространственно-временной структуры синергий.

Методы снижения размерности используют новые, формальные переменные, являющиеся линейной комбинацией исходных переменных, с помощью которых исходная матрица X разлагается на произведение двух матриц: $X=T \times P+E$, где T – матрица счетов, P – матрица нагрузок, E – матрица остатков. Новые формальные переменные и являются компонентами (факторами). Критериями выделения факторов (синергий) являлись величины рассчитанных собственных значений и процент дисперсии, которую учитывает каждый фактор в общем наборе данных. Синергия является одной структурной единицей управления, а рассматриваемыми переменными являются ее элементы – мышцы. Поскольку в структуре синергии должен быть как минимум один управляемый элемент (мышца), то факторы с собственными значениями менее единицы не рассматривались. Факторы, объясняющие менее 5% общей дисперсии данных, считали шумом и тоже не учитывались.

Матрица счетов (T) определяет временную организацию выявленных синергий и представляет собой проекции исходных данных на подпространство главных компонент. Каждый столбец матрицы является вектором координаты точки в пространстве главных компонент. Он дает информацию о наличии синхронно изменяющихся сигналов (ЭМГ мышц) в структуре каждого компонента. Изменение кривой в сторону положительных значений свидетельствует о возрастании линейной зависимости сигналов с тенденцией к увеличению (возрастание электроактивности ЭМГ), а в сторону отрицательных значений к уменьшению (снижение ЭМГ-активности). Каждый столбец матрицы нагрузок (P) состоит из коэффициентов, связывающих переменные, и является проекцией всех переменных на ось главных компонент. Коэффициенты, демонстрирующие высокие значения (> 0.65), указывают на высокую линейную зависимость элементов (изменений электроактивности мышц) выделенного фактора (синергии), от 0.35 до 0.65 – среднюю, и менее 0.35 – низкую. Таким образом, при рассмотрении электромиограмм, данные их векторов в пространстве главных компонент (коэффициенты активации) могут дать информацию о том, как изменяется структура синергий, обусловленная активностью отдельных мышц в ее структуре (весовые коэффициенты) [6,7].

Множественный регрессионный анализ выполняли в Statistica, применяя стандартный модуль "Multiple Linear Regression". Осуществляли анализ корреляционных матриц на предмет: мультиколлинеарности; достоверности получаемых β -коэффициентов; нормальности распределения остатков, соответствия предсказанных и наблюдаемых значений [8]. В случае положительной проверки по этим параметрам регрессионную модель считали приемлемой. Анализировали коэффициенты детерминации (R^2).

Математико-статистическая обработка данных включала расчет среднего арифметического (M), ошибки среднего арифметического (SE), стандартного отклонения (SD), коэффициентов вариативности (CV). Коэффициенты вариативности в диапазоне до 30% считали низким уровнем, от 31 до 70% – средним и более 71% – высоким. При сравнении коэффициентов активации синергий рассчитывали и анализировали кросс-корреляционные функции с учетом знака и смещения их максимального значения относительно нуля. Для сравнения количества модулей, доли дисперсии, весовых коэффициентов разных упражнений применяли дисперсионный анализ с апостериорным по критерию Newman-Keuls при уровне значимости 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ количества извлекаемых факторов показал отсутствие статистически значимых различий при выполнении разных бросков мяча. В среднем регистрировали от двух до четырех модулей, формируемых на мышечном, а также на кинематическом уровне (табл. 1). Наибольшее количество мышечных синергий было выявлено при выполнении броска мяча в сторону – 3.83 ± 0.17 , а меньшее было зарегистрировано при броске стоя на коленях – ровно три. Взаимодействие суставных углов оказывалось

структурировано, преимущественно, в три модуля, и лишь в некоторых упражнениях было зарегистрировано большее или меньшее их количество. Процент общей дисперсии извлекаемых факторов на мышечном и кинематическом уровне превышал 80%, что свидетельствует о высоком качестве реконструкции исходных данных.

Таблица 1. Количество извлекаемых мышечных синергий и кинематических модулей при выполнении разных бросков мяча ($M \pm m$)

Движение	Кол-во (ед.)		VAF (%)	
	МС	КинС	МС	КинС
1	3.50±0.22	3.00±0.00	81.76±1.91	90.51±1.91
2	3.50±0.22	3.17±0.17	81.74±0.89	90.63±0.89
3	2.83±0.31	2.67±0.21	84.95±1.29	90.18±1.29
4	3.83±0.17	3.00±0.00	81.50±1.34	93.39±1.34
5	3.00±0.26	3.17±0.17	83.31±1.30	90.28±1.30
6	3.67±0.21	2.67±0.21	85.55±0.94	92.51±0.94
7	3.00±0.00	3.00±0.00	82.66±1.26	92.51±1.26
8	3.67±0.21	3.00±0.26	83.78±1.08	88.81±1.08

1 – бросок вперед правой рукой, 2 – бросок вперед левой рукой, 3 – бросок вперед двумя руками, 4 – бросок правой рукой в сторону, 5 – бросок правой рукой назад, 6 – бросок из-за спины вперед правой рукой, 7 – бросок стоя на коленях вперед правой рукой, 8 – бросок из седа вперед правой рукой.

На рис. 2 представлены усредненные внутрииндивидуальные профили мышечных и кинематических модулей при реализации разных бросков мяча. Временная структура первого мышечного модуля практически всех упражнений характеризовалась одним пиком активации, приходящимся на первую четверть движения. Исключение составляли бросок правой рукой назад и бросок из-за спины, при реализации которых у ряда испытуемых регистрировали пик активации в середине упражнения. Следует отметить, что в названных упражнениях регистрировались схожие временные паттерны, но со смещением во времени в сторону середины движения. Кинематические профили активации этого же модуля во всех упражнениях демонстрировали один пик в разные периоды. Так, при броске мяча правой, левой и обеими руками вперед, а также назад и в сторону пик приходился на середину упражнения. При броске стоя на коленях, основной пик синхронизации межсуставного взаимодействия приходился на начало движения. При броске из-за спины правой рукой практически все испытуемые имели схожие паттерны активации, но различия заключались в расположении основного пика (рис. 2).

В большинстве упражнений основной пик активации второй синергии на мышечном уровне приходился на вторую четверть. Также было отмечено, что пики внутрииндивидуальных профилей при реализации броска правой рукой назад и из-за спины вперед имели схожий паттерн, но находились в разных временных отрезках упражнений (рис. 3). Так, половина обследуемого контингента демонстрировали возрастание активности второй мышечной синергии в начале упражнения, а для других исследуемых было характерно возрастание синхронизации мышечной активности во второй четверти. При реализации броска правой рукой из-за спины временные профили у раз-

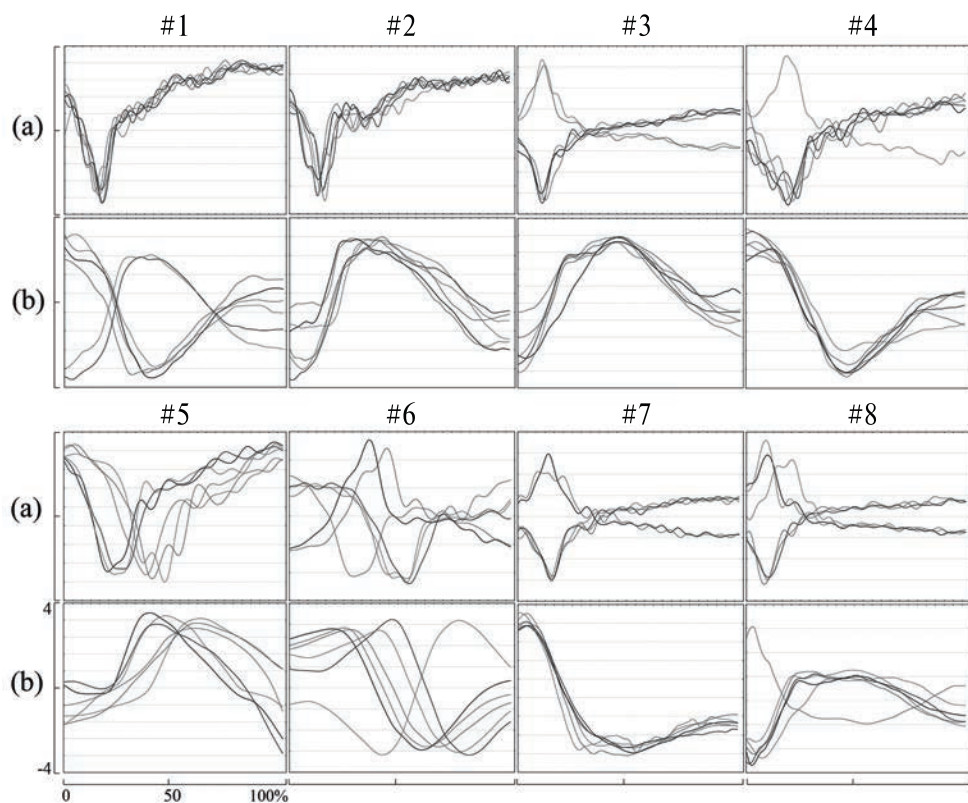


Рис. 2. Усредненные внутрииндивидуальные профили активации первой мышечной синергии (а) и кинематического модуля (б) при выполнении упражнений. 1 – бросок вперед правой рукой, 2 – бросок вперед левой рукой, 3 – бросок вперед двумя руками, 4 – бросок правой рукой в сторону, 5 – бросок правой рукой назад, 6 – бросок из-за спины вперед правой рукой, 7 – бросок стоя на коленях вперед правой рукой, 8 – бросок из седа вперед правой рукой. По оси абсцисс – у.е., по оси ординат – прогресс движения.

ных испытуемых демонстрировали большую вариативность, тем не менее основной пик активации у большинства из них приходился на середину упражнения (рис. 3).

Сравнительный анализ коэффициентов активации первой мышечной синергии показал высокое сходство профилей большинства рассматриваемых упражнений за исключением броска правой рукой назад и броска из-за спины. Самые высокие коэффициенты кросскорреляционных функций были получены при сопоставлении паттернов броска правой рукой вперед и броска стоя на коленях вперед правой рукой – 0.94 ± 0.01 в среднем по группе, а их вариативность не превышала 2.17%. Следует отметить, что коэффициенты вариативности упражнений, временные профили которых демонстрировали высокое сходство (> 0.9), имели очень низкие значения, не превышающие 5.24%. Меньшее соответствие коэффициентов активации первой мышечной синергии было получено для всех упражнений при сопоставлении их с броском правой рукой назад и из-за спины. Например, сравнивая бросок правой рукой вперед и названные выше упражнения, коэффициенты кросскорреляции составляли 0.61 ± 0.09 и 0.63 ± 0.07 соответственно. Вариативность в обоих случаях оценивалась как средняя

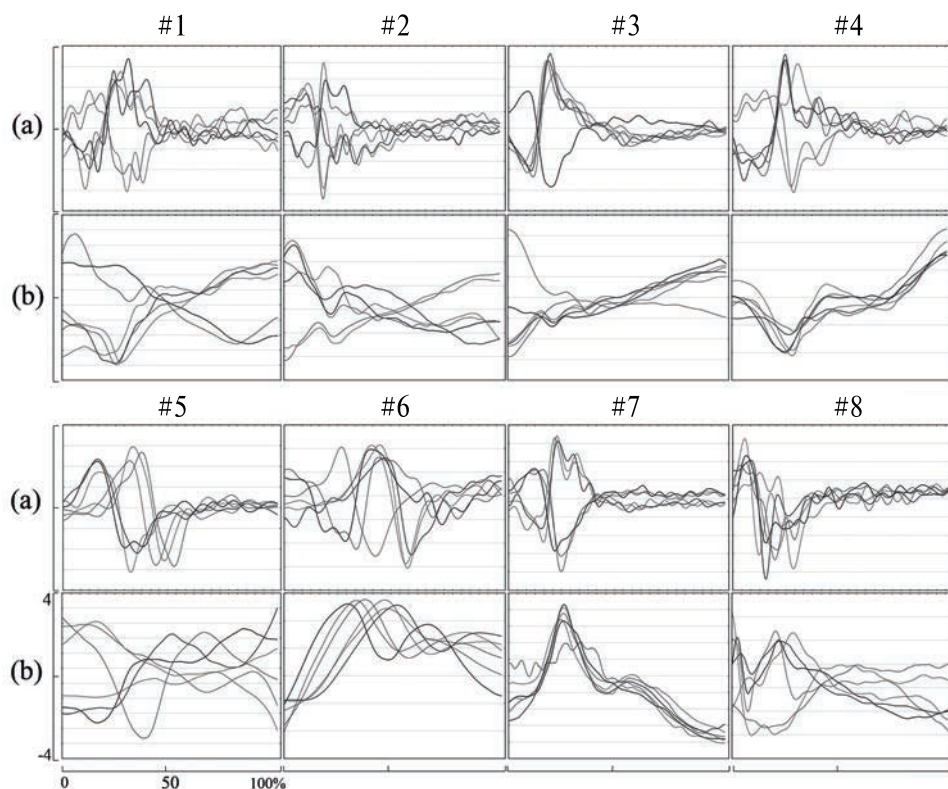


Рис. 3. Усредненные внутрииндивидуальные профили активации второй мышечной синергии (а) и кинематического модуля (б) при выполнении движений из разных исходных положений и направлениях броска мяча. 1 – бросок вперед правой рукой, 2 – бросок вперед левой рукой, 3 – бросок вперед двумя руками, 4 – бросок правой рукой в сторону, 5 – бросок правой рукой назад, 6 – бросок из-за спины вперед правой рукой, 7 – бросок стоя на коленях вперед правой рукой, 8 – бросок из седа вперед правой рукой. По оси абсцисс – у.е., по оси ординат – прогресс движения.

(47.36% и 33.47%). Аналогичная картина наблюдалась и на кинематическом уровне, где большинство упражнений демонстрировали высокое сходство паттернов активации. В меньшей степени обнаружено соответствие всех рассматриваемых упражнений с броском назад и броском вперед, стоя на коленях. В этих случаях коэффициенты кросскорреляции оценивались как средние и находились в диапазоне от 0.51 ± 0.10 до 0.69 ± 0.12 при CV , достигающих 34.84%.

Вторая мышечная синергия демонстрировала, преимущественно, среднее сходство при реализации разных упражнений. Однако были зарегистрированы и высокие коэффициенты, например, бросок правой рукой в сторону и бросок, стоя на коленях, демонстрировали высокое сходство с броском правой и левой рукой вперед. Коэффициенты кросскорреляционных функций находились в диапазоне от 0.78 ± 0.02 до 0.90 ± 0.01 , при CV , не превышающих 8.11%. При сопоставлении коэффициентов активации на кинематическом уровне было установлено высокое сходство структуры броска вперед правой рукой со всеми упражнениями, за исключением броска правой назад и из-за спины вперед. Также было отмечено высокое сходство паттернов временной активации бро-

ска правой рукой в сторону с бросками, стоя на коленях и из седа. Здесь коэффициенты составляли 0.87 ± 0.02 и 0.76 ± 0.02 соответственно.

На следующем этапе анализа были рассчитаны весовые коэффициенты в структуре выделяемых факторов (синергий) для каждой мышцы при реализации разных упражнений (рис. 4). Структура первой мышечной синергии определялась скелетными мышцами, демонстрирующими высокие весовые коэффициенты (> 0.7). Например, для локтевого разгибателя запястья правой руки при реализации большинства упражнений они составляли от 0.76 ± 0.02 до 0.79 ± 0.02 при низкой вариативности – не более 7.26%. Помимо этого высокое вовлечение в первую мышечную синергию при выполнении практически всех бросков было установлено для мышц правой стороны тела: трехглавой мышцы плеча, верхних пучков трапецевидной, широчайшей мышцы спины и двуглавой мышцы плеча. Кроме этого, верхние пучки трапецевидной мышцы левой стороны также были задействованы в высокой степени во всех упражнениях с мячом. Следует отметить, что мышцы, у которых были зарегистрированы высокие весовые коэффициенты, имели и низкие значения коэффициентов вариативности включения их в синергию, чаще всего не превышающие 10%. Особо можно отметить среднюю и высокую вариативность вовлечения некоторых мышц в первую синергию при выполнении броска из-за спины вперед, где CV оказывались более 30%. Например, для трехглавой мышцы плеча и передней части дельтовидной мышцы левой стороны CV составляли 77.80% и 80.65% соответственно. Некоторые мышцы в структуре первой синергии оказывались задействованы в равной степени при реализации разных бросков мяча, на что указывает отсутствие статистически значимых различий весовых коэффициентов. Таковыми являлись локтевой разгибатель запястья, лучевой сгибатель запястья, верхние пучки трапецевидной мышцы, широчайшая мышца спины и двуглавая мышца плеча правой стороны. Кроме того, локтевой разгибатель запястья и широчайшая мышца спины левой стороны также не имели достоверных различий весовых коэффициентов при реализации разных упражнений.

Вторая мышечная синергия включала меньшее количество мышц, имеющих высокие весовые коэффициенты. Так, для прямой мышцы живота правой стороны они составляли 0.82 ± 0.04 и 0.80 ± 0.03 при реализации бросков, стоя на коленях, и из седа (рис. 4). При реализации броска правой рукой назад весовые коэффициенты лучевого сгибателя запястья составляли в среднем по группе 0.71 ± 0.02 . Прямая мышца живота демонстрировала высокое вовлечение во вторую мышечную синергию при выполнении броска правой рукой вперед, двумя руками вперед и броска вперед, стоя на коленях. Здесь весовые коэффициенты находились в диапазоне от 0.71 ± 0.03 до 0.82 ± 0.01 . Дельтовидные мышцы левой стороны тела также оказывались в высокой степени задействованы при выполнении броска назад и броска из-за спины (рис. 4). Весовые коэффициенты других исследуемых мышц при реализации разных упражнений демонстрировали средние и низкие весовые коэффициенты. Как и в первой мышечной синергии, мышцы, имеющие высокие весовые коэффициенты, демонстрировали низкую вариативность и соответственно высокую стабильность их включения в структуру второй синергии при их межиндивидуальном рассмотрении (CV не более 10%). В структуре данной мышечной синергии было установлено отсутствие статистически значимых различий весовых коэффициентов у семи скелетных мышц при реализации разных упражнений. Таковыми являлись локтевой разгибатель запястья обеих сторон тела, лучевой сгибатель запястья и двуглавая мышца плеча правой стороны, а также трапецевидная и широчайшая мышца спины левой стороны.

На рис. 5 приведены весовые коэффициенты суставных углов в структуре первых кинематических модулей. Так, при выполнении броска правой рукой вперед первый модуль характеризовался высокой синхронизацией изменений голеностопного, плечевого, тазобедренного и шейного углов правой стороны тела. Здесь коэффициенты находились в диапазоне от 0.76 ± 0.02 до 0.91 ± 0.02 , их вариативность оценивалась как

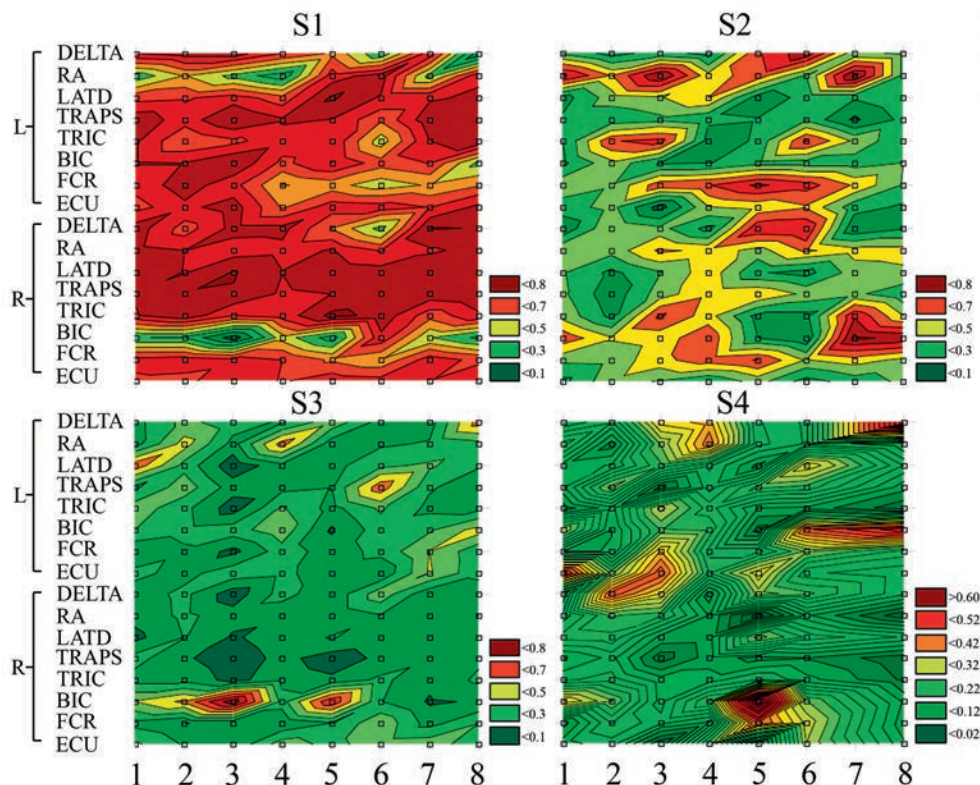


Рис. 4. Весовые коэффициенты в структуре мышечных синергий при реализации разных бросков мяча. L – левая сторона, R – правая сторона. 1 – бросок вперед правой рукой, 2 – бросок вперед левой рукой, 3 – бросок вперед двумя руками, 4 – бросок правой рукой в сторону, 5 – бросок правой рукой назад, 6 – бросок из-за спины вперед правой рукой, 7 – бросок стоя на коленях вперед правой рукой, 8 – бросок из седа вперед правой рукой. S1-S4 – номер мышечной синергии.

низкая и не превышала 12.72%. Отмечена закономерность, заключающаяся в увеличении синхронизации изменений величин суставных углов при выполнении бросков мяча в направлении назад и из-за спины, а также в исходных положениях, стоя на коленях, и из седа. Например, при броске из-за спины высокие весовые коэффициенты в структуре первого кинематического модуля демонстрировали голеностопные, коленные, шейные углы правой, а также локтевой и плечевой суставы левой стороны тела. Диапазон значений коэффициентов составлял от 0.76 ± 0.02 до 0.93 ± 0.01 при низких CV, не превышающих 12.23%.

Второй кинематический модуль включал значительно меньшее число суставов, демонстрирующих высокую степень синхронизации. Например, при броске вперед правой рукой весовые коэффициенты плечевого сустава левой стороны составляли 0.79 ± 0.06 . Для коленного правого и тазобедренного левого они были 0.68 ± 0.04 и 0.66 ± 0.08 соответственно. В структуре второго кинематического модуля большинства упражнений количество суставных углов, проявляющих высокую синхронизацию, не превышало двух или трех. Так, при броске из-за спины высокие коэффициенты имели тазобедренные суставы – выше 0.84 ± 0.05 . В некоторых упражнениях, например,

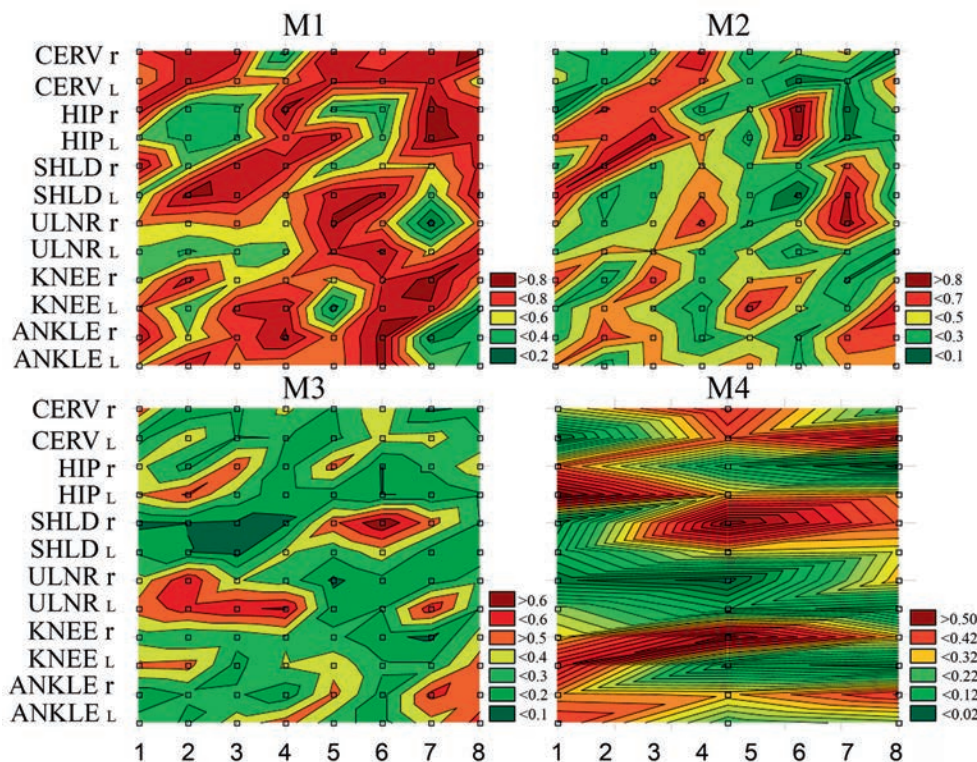


Рис. 5. Весовые коэффициенты в структуре кинематических модулей при реализации разных бросковых движений. r – правая сторона, L – левая сторона. 1 – бросок вперед правой рукой, 2 – бросок вперед левой рукой, 3 – бросок вперед двумя руками, 4 – бросок правой рукой в сторону, 5 – бросок правой рукой назад, 6 – бросок из-за спины вперед правой рукой, 7 – бросок стоя на коленях вперед правой рукой, 8 – бросок из седа вперед правой рукой. M1-M4 – номер кинематического модуля.

при броске из седа и броске назад, второй кинематический модуль включал единственный суставной угол с высоким коэффициентом.

Весовые коэффициенты для голеностопного сустава правой стороны лишь в двух упражнениях имели достоверные различия в структуре первого кинематического модуля (рис. 5). Весовые коэффициенты коленного сустава правой стороны также при сравнении большей части упражнений существенно не различались ($p > 0.05$). Аналогичные результаты демонстрировали локтевой сустав правой и шейные суставы обеих сторон тела. В структуре второго кинематического модуля практически полное отсутствие достоверных различий весовых коэффициентов при сравнении разных упражнений демонстрировали голеностопный и локтевой суставы левой, а также плечевой и шейный суставы левой стороны тела.

Далее анализировали зависимости между мышечными синергиями и кинематическими модулями в структуре рассматриваемых упражнений и между ними. При регрессионном анализе в качестве зависимых переменных поочередно выступали вариационные ряды коэффициентов активации (усредненные межиндивидуальные профили) кинематических модулей, а независимыми переменными являлись коэффициенты активации мышечных синергий (табл. 2).

Таблица 2. Коэффициенты детерминации при анализе зависимостей между мышечными синергиями и кинематическими модулями в структуре разных упражнений**Кин 1**

1	0.34 (1–4)	0.42 (1–4)	0.54 (1–4)	0.41 (1–4)	0.79 (1–4)	0.66 (1–3)	0.76 (1–4)	0.66 (2–4)
2		0.47 (1–4)	0.63 (1–4)	0.53 (1–4)	0.85 (1–4)	0.62 (1–4)	0.71 (1–4)	0.71 (1–4)
3			0.71 (1–4)	0.64 (1–4)	0.58 (1–3)	0.82 (1–4)	0.81 (1–4)	0.66 (1–4)
4				0.67 (1–4)	0.88 (1–4)	0.82 (1–4)	0.85 (1–4)	0.78 (1–4)
5					0.91 (1–4)	0.50 (2–4)	0.17 (1–4)	0.36 (1,3,4)
6						0.77 (1–4)	0.53 (2–4)	0.57 (1,3,4)
7							0.72 (1–3)	0.54 (1–3)
8								0.66 (1–4)

Кин 2

1	0.94 (1–4)	0.91 (1–4)	0.81 (1–4)	0.83 (1,2,4)	0.94 (1–4)	0.75 (1–3)	0.84 (1,2,4)	0.77 (1–4)
2		0.72 (1–4)	0.79 (1–3)	0.80 (1–4)	0.78 (1–4)	0.81 (1–4)	0.87 (1–3)	0.66 (1,2)
3			0.68 (1–4)	0.69 (1–4)	0.82 (1,2,4)	0.76 (1–4)	0.60 (1–3)	0.66 (1–4)
4				0.83 (1–4)	0.80 (1–4)	0.80 (1–4)	0.85 (1,2,4)	0.77 (1–4)
5					0.12 (2–4)	0.84 (1–4)	0.94 (1–3)	0.41 (1,2,4)
6						0.81 (1–4)	0.89 (1–4)	0.47 (1,3,4)
7							0.72 (1–3)	0.73 (1–3)
8								0.67 (1–4)
	1	2	3	4	5	6	7	8

1 – бросок вперед правой рукой, 2 – бросок вперед левой рукой, 3 – бросок вперед двумя руками, 4 – бросок правой рукой в сторону, 5 – бросок правой рукой назад, 6 – бросок из-за спины вперед правой рукой, 7 – бросок стоя на коленях вперед правой рукой, 8 – бросок из седа вперед правой рукой. Кин1,2 – номер кинематического модуля. Заливкой выделены высокие коэффициенты (> 0.7). Значения в скобках обозначают номер мышечной синергии, удовлетворяющей критериям включения в регрессионную модель.

Наибольшее количество значимых связей обнаружено со вторым кинематическим модулем. Здесь коэффициенты детерминации всех рассматриваемых упражнений находились в диапазоне от 0.77 до 0.94, при этом в большинстве случаев они включали как минимум три мышечные синергии, удовлетворяющие критериям включения их в регрессионную модель. С первым модулем на кинематическом уровне регистрировались высокие и средние коэффициенты, в среднем для каждого упражнения были выявлены высокие связи с половиной из рассматриваемых упражнений. С третьим кинематическим модулем преимущественно регистрировались низкие связи.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе предполагалось выяснить, возможно ли построение целостных движений, относящихся к категории профилирующих элементов в художественной гимнастике, на основе общих синергетических модулей, организованных на мышечном уровне. Сама идея упрощения двигательного контроля заключается в использовании управляющей системой общей структуры для формирования мышечных паттернов в виде комбинаций небольшого числа модулей, специфичных для конкретной задачи или группы задач [1, 9]. Доказательства такой организации представлены при изучении локомоторной активности человека, где удалось выявить общие мышечные модули при выполнении таких задач как ходьба, бег, педалирование и ряд других [10, 11]. Установлены общие мышечные модули, задействуемые в реализации задач по захвату предметов рукой, находящихся на разном удалении и направлении [12, 13]. Были предприняты попытки найти общие мышечные синергии, посредством которых обеспечивается поддержание вертикальной позы и ходьбы [10]. Идентифицированы мышечные модули, которые задействуются в реакциях на внешнее воздействие при стоянии, аналогичные используемым при компенсации возмущающих воздействий при ходьбе [14]. Эти сведения приводят как доказательство модульной организации управления движениями человека, а также как подтверждение существования общих и специфичных для разных двигательных задач мышечных синергий [9, 15]. Тот факт, что находятся связи параметров выявляемых модулей с кинематикой определенных фаз и периодов движений свидетельствует о том, что синергии могут быть связаны с выполнением конкретной функции на уровне одного или нескольких сегментов тела. Возможно, эти синергии, выделяемые на уровне подзадач, и являются общими для широкого спектра однотипных движений. В этой связи логично ожидать, что параметры пространственно-временного структурирования мышечных синергий, в частности, степень синхронизации отдельных мышц, принимающих участие в движениях определенного сегмента (или ряда сегментов), будет высокой. Это предположение находит подтверждение в наших исследованиях.

При рассмотрении весовых коэффициентов в структуре синергий, выявленных для разных бросков мяча, мы обращали внимание на два аспекта. Первый связан с выделением мышц, имеющих высокие весовые коэффициенты, в структуре модулей. Такие мышцы имеют явную синхронизацию активности и формируют временной паттерн активации. Разумеется, другие мышцы, демонстрирующие меньшие коэффициенты, могут быть задействованы в синергии, но степень их участия в синергии и роль в формировании паттернов активации значительно меньше. Второй аспект анализа предусматривал сравнение весовых коэффициентов вне зависимости от их величины. Таким образом, при сопоставлении разных упражнений мы оценивали количество мышц, формирующих основной паттерн активации, и степень вовлечения всех мышц в синергии при выполнении разных упражнений. Мы установили, что практически половина исследуемых мышц оказались вовлечены (демонстрировали высокие коэффициенты) в первую мышечную синергию. Таковыми являлись мышцы предплечья, двуглавая мышца плеча, трапециевидная и широчайшая мышца спины правой стороны тела, а также локтевой разгибатель кисти, трапециевидная мышца и широчайшая мышца спины левой стороны. Их вариативность при межиндивидуальном рассмотрении была низкой, это свидетельствует о том, что структура данной синергии характерна для всех испытуемых и не является индивидуальной особенностью. В большинстве случаев в этих же мышцах не обнаруживались статистически значимые различия в величинах весовых коэффициентов при реализации разных упражнений. Легко заметить, что выявленные мышцы в структуре первой синергии задействованы в перемещении сегментов тела правой верхней конечности, осуществляющей основное движение, т.е. их активация связана с конкретной функцией. Активность ряда мышц в структуре этой же

синергии, вероятно, связана со стабилизацией положения туловища во время броска. Таким образом, основная синергия (первая) может обеспечивать две функции, связанные с активным перемещением сегментов тела или стабилизацией определенного положения тела, и это характерно для всех рассматриваемых нами упражнений.

Во второй мышечной синергии высокие весовые коэффициенты были выявлены преимущественно для прямой мышцы живота и дельтовидной мышцы обеих сторон тела в структуре упражнений, выполняемых без зрительного контроля, либо из исходных положений, ограничивающих подвижность определенных звеньев тела. Кроме того, не было установлено существенных различий весовых коэффициентов для тех же мышц, которые были в высокой степени задействованы в первой мышечной синергии. Данные закономерности могут быть описаны, исходя из понятия о специфических мышечных синергиях, которые задействуются в движениях, реализуемых в необычных условиях или при внешнем воздействии, вынуждающем управляющую систему менять стратегию контроля, а именно включать ранее не задействованные синергии или менять структуру используемых [16]. Наиболее ярко такие перестройки были продемонстрированы при рассмотрении локомоций человека. Так, ходьба по ровной поверхности в обычных условиях может быть описана пятью пространственно-временными синергиями на мышечном уровне [2]. При изменении условий, например, при ходьбе по неровной опоре, увеличивается количество выявляемых модулей и наблюдается изменение степени участия скелетных мышц в их структуре [17]. Мы не наблюдали существенных различий (в среднем по группе) по количеству извлекаемых мышечных модулей в структуре разных упражнений. В некоторых реализациях даже одного упражнения наблюдались небольшие вариации количества задействованных модулей, вероятно, связанные с вычислительными аспектами применяемого метода факторизации, либо с вариативностью как принципом организации всех биологических систем. Однако вторая мышечная синергия включала высокие весовые коэффициенты ряда мышц только для двух из всех рассматриваемых упражнений, т.е. можно говорить о специфической мышечной синергии, которая в большей степени задействуется при выполнении двигательной задачи в нестандартных условиях.

Условия реализации стандартной двигательной задачи должны отражаться на координационных отношениях мышц, задействованных в движении, особенно ярко это выражалось при рассмотрении временной структуры выделяемых мышечных модулей. Броски, выполняемые из исходных положений, стоя на коленях, и из седа, имели уникальные паттерны временной активации, отличные от других упражнений и по форме и по выраженности основных пиков. Это вполне логично, поскольку на структуру межсуставного взаимодействия может оказывать влияние искусственное ограничение степеней свободы, не связанное с центральными процессами управления, т.е. само исходное положение не позволяет задействовать ряд суставов. Броски, выполняемые в направлении назад и из-за спины вперед, имели схожие паттерны с некоторыми упражнениями, однако, практически все индивидуальные профили их активации приходились на разные временные периоды движения. Кроме того, движения, реализуемые без зрительного контроля, а также выполняемые из нестандартных исходных положений или недоминирующей рукой, характеризовались вовлечением в кинематические модули большего числа суставов, несмотря на наличие искусственного ограничения степеней свободы в ряде движений. Таким образом, упражнения, связанные с броском мяча в разных направлениях, но при условии наличия зрительного контроля за результатом движения и опоры на обе стопы, могут быть построены на основе общих мышечных модулей, имеющих схожую временную организацию. В условиях ограничения зрительного контроля и в положениях, ограничивающих подвижность ряда суставов, наблюдаются специфичные паттерны активации синергий. Следует отметить, что обсуждаемые закономерности синергетического взаимодействия скелетных мышц были характерны и для кинематического уровня исследования синергий.

Методы снижения размерности данных, широко применяемые для выявления синергетических эффектов на мышечном уровне, позволяют получать те же характеристики на кинематическом, однако, на наш взгляд, такие кинематические модули скорее относятся к категории стабилизируемых переменных и их следует рассматривать как отдельную контролируемую единицу. Понятие стабилизируемых переменных исходит из определения синергии как организации множества элементов управляемой системы с целью стабилизации важных для успешной реализации двигательной задачи переменных контроля [18–20]. Под управляемыми элементами, как правило, понимают мышечные группы, объединенные в модули низкой размерности, а переменные контроля могут включать кинематические характеристики движения. Определение важных переменных является сложной задачей, чаще они выявляются интуитивно и проверяются экспериментальным путем. Важность выделения таких переменных подчеркивается в положениях концепции «неконтролируемого многообразия», где две категории переменных образуют два независимых пространства, в разной степени влияющих на производительность [21]. Оценка соотношения дисперсии данных, регистрируемой при многократных реализациях модельного движения, позволяет судить о степени проявления синергизма. Если исходить из предположения о том, что мышечных синергий ограниченное небольшое количество, и они гибко задействуются в реализации широкого спектра произвольных движений, то их применение для стабилизации множества важных переменных представляется нецелесообразным, тем более что при рассмотрении сложных по координации движений, впрочем, как и любых других фундаментальных моделей двигательного поведения человека, выявляются не более пяти-шести мышечных модулей. Несмотря на показанную возможность гибкой настройки координационных отношений мышц в структуре таких образований, решение двигательных задач с множеством возможных соотношений характеристик движения на кинематическом уровне посредством такого количества мышечных объединений представляется маловероятным.

Мы предположили, что принцип управления на основе объединения в модули для упрощения контроля может быть применен не только к исполнительным органам (мышцам), но и к организации контролируемых переменных. Такая возможность была показана нами ранее при изучении роли синергий в процессе регуляции позы при выполнении сложных спортивных равновесий [22]. Теоретической базой для обоснования такого предположения может являться концепция о системе внутреннего представления тела, описывающая взаимное положение звеньев тела на базе сложной информационной структуры – внутренней модели или схемы, базирующейся преимущественно на интеграции зрительной и проприоцептивной информации. Система внутреннего представления может включать не только схему собственного тела, но и систему координат, в которой описывается ориентация и движение тела относительно внешнего пространства [23, 24]. В этой связи представление о движениях сегментов тела, объединенных по модульному принципу, и воздействие на них посредством мышечных синергий представляется возможным. Для оценки взаимодействия сегментов тела можно использовать величины основных суставных углов, а степень синхронизации их изменений в процессе реализации двигательной задачи будет являться расставляемой переменной контроля. С помощью регрессионного анализа нам удалось установить, что практически во всех рассматриваемых упражнениях мышечные синергии имели высокие взаимосвязи с одним из кинематических модулей, причем в его стабилизации чаще были задействованы все мышечные синергии. Тот факт, что усредненные внутрииндивидуальные временные паттерны активации мышечных синергий находят взаимосвязи с кинематическими модулями, полученными при рассмотрении структуры разных двигательных действий, свидетельствует о действительном существовании общих мышечных синергий, которые задействуются при организации разных по структуре движений, относящихся к одной категории упражнений в художественной гимнастике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, лица, овладевшие сложным специфическим двигательным навыком, могут демонстрировать схожие стратегии двигательного контроля. Это проявляется в структурировании межмышечного взаимодействия в виде единых модулей, которые задействуются при реализации разных двигательных задач. При выполнении упражнений оказываются задействованы две основные мышечные синергии, обеспечивающие активное перемещение верхней конечности и стабилизацию положения туловища. Специфика пространственно-временной организации синергий на мышечном уровне проявляется при реализации упражнений, выполняемых без зрительного контроля, либо из исходных положений, ограничивающих подвижность определенных звеньев тела. Решение проблемы координации множества элементов управляемой системы может заключаться не только в снижении количества мышц, задействованных в управлении, но и в организации переменных контроля в виде модулей на кинематическом уровне и их стабилизации посредством мышечных синергий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотруднику Научно-исследовательского института проблем спорта и оздоровительной физической культуры Великолукской государственной академии физической культуры и спорта Пухову А. М. за помощь в проведении исследований.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

С. А. М.— планирование, организация и участие в проведении экспериментов, регистрация и анализ полученных данных, обработка данных, подготовка текста рукописи. С. М. И.— участие в проведении экспериментов, обработка данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Великолукской государственной академии физической культуры и спорта. 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 Комитетом по этике Великолукской государственной академии физической культуры и спорта, протокол № 3 от 10 октября 2022 года. Каждый участник 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. *D'Avella A* (2016) Modularity for Motor Control and Motor Learning. *Adv Exp Med Biol* 957: 3–19.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-47313-0_1
2. *Ivanenko YP, Poppele RE, Lacquaniti F* (2004) Five basic muscle activation patterns account for muscle activity during human locomotion. *J Physiol* 556(1): 267–282.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.057174>

3. *Frère J, Hug F* (2012) Between-subject variability of muscle synergies during a complex motor skill. *Front Comput Neurosci* 28(6): 99.
<https://doi.org/10.3389/fncom.2012.00099>
4. *Torres-Oviedo G, Ting LH* (2010) Subject-specific muscle synergies in human balance control are consistent across different biomechanical contexts. *J Neurophysiol* 103(6): 3084–3098.
<https://doi.org/10.1152/jn.00960.2009>
5. *Moiseev S, Pukhov A, Mikhailova E, Gorodnichev R* (2022) Methodological and computational aspects of extracting extensive muscle synergies in moderate-intensity locomotions. *J Evol Biochem Phys* 58: 88–97.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022010094>
6. *Turpin N, Uriac S, Dalleau G* (2021) How to improve the muscle synergy analysis methodology? *Eur J Appl Physiol* 121(4): 1009–1025.
<https://doi.org/10.1007/s00421-021-04604-9>
7. *Cheung V, d'Avella A, Bizzi E* (2009) Adjustments of motor pattern for load compensation via modulated activations of muscle synergies during natural behaviors. *J Neurophysiol* 101(3): 1235–1257.
<https://doi.org/10.1152/jn.01387.2007>
8. *Радченко СГ* (2011) Методология регрессионного анализа. К. Корнийчук. [*Radchenko SG* (2011) Methodology of regression analysis. K. Kornijchuk. (In Russ)].
9. *D'Avella A, Bizzi E* (2005) Shared and specific muscle synergies in natural motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8): 3076–3081.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0500199102>
10. *De Marchis C, Schmid M, Bibbo D, Bernabucci I, Conforto S* (2013) Inter-individual variability of forces and modular muscle coordination in cycling: a study on untrained subjects. *Hum Mov Sci* 32(6): 1480–1494.
<https://doi.org/10.1016/j.humov.2013.07.018>
11. *McGowan CP, Neptune RR, Clark DJ, Kautz SA* (2010) Modular control of human walking: adaptations to altered mechanical demands. *J Biomech* 43(3): 412–419.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.10.009>
12. *Jarque-Bou N, Scano A, Atzori M, Müller H* (2019) Kinematic synergies of hand grasps: a comprehensive study on a large publicly available dataset. *J Neuroeng Rehabil* 16(1): 63.
<https://doi.org/10.1186/s12984-019-0536-6>
13. *Scano A, Chiavenna A, Molinari Tosatti L, Müller H, Atzori M* (2018) Muscle Synergy Analysis of a Hand-Grasp Dataset: A Limited Subset of Motor Modules May Underlie a Large Variety of Grasps. *Front Neurobot* 12: 57.
<https://doi.org/10.3389/fnbot.2018.00057>
14. *Chvatal S, Ting L* (2013) Common muscle synergies for balance and walking. *Front Comput Neurosci* 7: 48.
<https://doi.org/10.3389/fncom.2013.00048>
15. *Kim M, Kim Y, Kim H, Yoon B* (2018) Specific muscle synergies in national elite female ice hockey players in response to unexpected external perturbation. *J Sports Sci* 36(3): 319–325.
<https://doi.org/10.1080/02640414.2017.1306090>
16. *Boccia G, Zoppirolli C, Bortolan L, Schena F, Pellegrini B* (2018) Shared and task-specific muscle synergies of Nordic walking and conventional walking. *Scand J Med Sci Sports* 28(3): 905–918.
<https://doi.org/10.1111/sms.12992>
17. *Saito, Tomita A, Ando R, Watanabe K, Akima H* (2018) Similarity of muscle synergies extracted from the lower limb including the deep muscles between level and uphill treadmill walking. *Gait Posture* 59: 134–139.
<https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2017.10.007>
18. *Scholz J, Schöner G* (1999) The uncontrolled manifold concept: identifying control variables for a functional task. *Exp Brain Res* 126(3): 289–306.
<https://doi.org/10.1007/s002210050738>
19. *Latash M* (2010) Motor synergies and the equilibrium-point hypothesis. *Motor Control* 14(3): 294–322.
<https://doi.org/10.1123/mcj.14.3.294>
20. *Nardon M, Pascucci F, Cesari P, Bertuccio M, Latash M* (2022) Synergies Stabilizing Vertical Posture in Spaces of Control Variables. *Neuroscience* 500: 79–94.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.08.006>
21. *Latash M, Levin MF, Scholz JP, Schöner G* (2010) Motor control theories and their applications. *Medicina* 46(6): 382–392.
22. *Моисеев С, Михайлова Е* (2023) Двигательные синергии в системе управления сложными спортивными равновесиями. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109(5): 612–628. [*Moiseev S, Mihajlova E* (2023) Motor synergies in the control system of complex sports balances. *Russ J Physiol* 109(5): 612–628. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923050060>

23. Гурфинкель ВС, Дебрева ЕЕ, Левик ЮС (1986) Роль внутренней модели в восприятии положения и планировании движения. Физиология человека 12(5): 769. [*Gurfinkel' VS Debreva EE, Levik YuS* (1986) The role of the internal model in position perception and movement planning. Human physiol 12(5): 769. (In Russ)].
24. Киреева Т, Левик Ю, Холмогорова Н (2005) Взаимодействие зрительной и проприоцептивной информации в восприятии положения руки. Рос журн биомехан 9(2): 74. [*Kireeva T, Levik Y, Holmogorova N* (2005) Interaction of visual and proprioceptive information in the perception of hand position. Russ J Biomech 9(2): 74. (In Russ)].

Spatial-Temporal Structure Features of Muscle Synergies During Profiling Elements Implementation in Rhythmic Gymnastics

S.A. Moiseev^{a, *}, and S.M. Ivanov^a

^a*Velikiye Luki State Academy of Physical Education and Sports, Velikiye Luki, Russia*

* e-mail: sergey_moiseev@vlgafc.ru

The article presents an analysis of the muscle synergies involved in making ball throws in different directions and from different starting positions. The study involved 6 highly qualified athletes engaged in rhythmic gymnastics. Electromyograms of the superficial muscles of the upper extremities and trunk were recorded synchronously during the movements, as well as video capture of the movements of body segments. Synergy parameters were extracted from the recorded signals using factor analysis using the principal component method. It has been established that individuals who have mastered a complex motor skill can demonstrate similar motor control strategies. This is manifested in the structuring of intermuscular interaction in the form of two general modules, the degree of involvement of muscles in which is highly similar in the implementation of different motor tasks. The first muscle module implements active movement of the upper limb by jointly activating the muscles of the forearm, shoulder and upper shoulder girdle, and also provides stabilization of the position of the trunk by synchronizing the activity of the muscles of the back and abdomen. The second muscle module is specific and is mainly associated with high involvement in the synergy of the muscles of the upper shoulder girdle and forearm for the implementation of exercises performed without visual control, or from starting positions that limit the mobility of certain parts of the body. Thus, the solution to the problem of coordination of many elements of the motor system may consist not only in reducing the number of executive organs – muscles involved in control, but also in organizing control variables in the form of modules at the kinematic level and their stabilization through muscle synergies.

Keywords: muscle synergies, kinematic modules, data factorization, motor control, rhythmic gymnastics

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ИНСУЛИНА
НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФАКТОРЫ ВОСПАЛЕНИЯ
У КОНТРОЛЬНЫХ И ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС В УСЛОВИЯХ
ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ**

© 2024 г. И. И. Зорина¹*, А. С. Печальнова¹, Е. Е. Черненко¹,
К. В. Деркач¹, А. О. Шпаков¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии
наук, Санкт-Петербург, Россия
*E-mail: zorina.inna.spb@gmail.com

Поступила в редакцию 22.04.2024 г.
После доработки 16.05.2024 г.
Принята к публикации 16.05.2024 г.

Поиск природных биологически активных веществ, оказывающих нейропротекторный эффект при церебральной ишемии и реперфузии, является одной из приоритетных задач современной нейробиологии и медицины. Интраназально вводимый инсулин (ИВИ) обладает выраженным восстанавливающим эффектом при различных нейродегенеративных заболеваниях, но механизмы его действия и терапевтические эффекты при церебральной ишемии практически не изучены, в том числе при сахарном диабете 2-го типа (СД2), который повышает риски развития цереброваскулярных дисфункций. Целью работы было исследовать влияние ИВИ на метаболические показатели и факторы воспаления у самцов крыс с СД2, подвергнутых ишемии-реперфузии мозга, в сравнении с недиабетическими животными. Для моделирования СД2 использовали длительную высокожировую диету с инъекцией крысам низкой дозы стрептозотоцина (25 мг/кг), а для изучения церебральной ишемии использовали модель глобальной двухсосудистой ишемии переднего мозга, вызванной окклюзией обеих общих каротидных артерий, с длительной реперфузией (ИшР). Через 2 ч после окончания ишемии крыс обрабатывали ИВИ (0.5 или 2.0 МЕ/крыса), после чего препарат вводили в тех же дозах ежедневно, на протяжении 7 дней. Установлено, что ИВИ препятствует потере массы тела как у недиабетических, так и у диабетических крыс, перенесших ИшР, а также повышает содержание общего холестерина и долю эпидидимального жира у крыс без СД2 после ИшР. У ишемических СД2-крыс ИВИ снижает уровни постпрандиальной глюкозы и инсулина в крови, что свидетельствует об улучшении толерантности к глюкозе, а также снижает уровни факторов воспаления – С-реактивного белка (в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки) и фактора-α некроза опухолей (в дозе 2 МЕ/крыса/сутки) в крови, что указывает на его противовоспалительный потенциал. Таким образом, курсовое применение ИВИ после индукции ишемии головного мозга приводит к улучшению метаболических показателей и ослабляет воспалительные реакции у крыс с СД2, что может быть востребовано при коррекции ишемического инсульта у пациентов с СД2.

Ключевые слова: церебральная ишемия, интраназальный инсулин, сахарный диабет 2-го типа, воспаление

ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания, среди которых транзиторные ишемические атаки и инсульт мозга, представляют важнейшую медико-социальную проблему. В большинстве развитых стран мира инсульт входит в лидирующую тройку причин в структуре общей смертности населения, в том числе в России [1]. Одной из причин инсульта могут быть эндокринные нарушения, в том числе ожирение, метаболический синдром и сахарный диабет 2-го типа (СД2). У пациентов с СД2 нарушена секреция инсулина, отмечаются гипергликемия, центральная и периферическая инсулинорезистентность, атерогенная дислипидемия и хроническое воспаление [2]. Наличие СД2 увеличивает риск цереброваскулярных заболеваний и повышает вероятность летального исхода и инвалидизации от заболеваний сосудистого русла [3]. При СД2 гипергликемия и дислипидемия в условиях избытка питательных веществ создают предпосылки для развития хронического воспаления, в том числе нейровоспаления, и комплекса осложнений микро- и макрососудистого русла [4].

К настоящему моменту не сложилось структурированного протокола для ведения пациентов с СД2 и церебральной ишемией, не определены оптимальные схемы их терапии в постишемический период и подходы к вторичной профилактике инсульта. Тем не менее нормализация уровня глюкозы у пациентов с СД2 является одним из подходов для профилактики и лечения инсульта, развивающегося на фоне диабетической патологии и гипергликемии. Инсулин, оказывающий мощное гипогликемическое действие и обладающий широким спектром центральных и периферических эффектов, в этом отношении рассматривается как препарат первой линии выбора, позволяющий поддерживать нормальный уровень глюкозы и снижать его вариабельность [5, 6].

Помимо периферического введения инсулина перспективным может быть интраназальный способ его доставки. Интраназально вводимый инсулин (ИВИ) обеспечивает непосредственное попадание гормона в мозг, где он реализует свое действие посредством активации инсулиновых рецепторов и функционально связанных с ними сигнальных каскадов [7]. В ходе постишемического периода инсулин мозга может оказывать нормализующее действие на гипоталамическую регуляцию пищевого поведения и энергетический метаболизм, оказывать нейропротекторное и нейромодуляторное действие, а также ослаблять симптомы постинсультной депрессии, таким образом осуществляя вторичную профилактику инсульта [8]. В настоящее время в доклинических и клинических исследованиях интенсивно изучаются эффекты ИВИ при лечении нейродегенеративных заболеваний, депрессии, метаболических расстройств, получены доказательства его эффективности и биобезопасности [7, 9–11]. Преимуществами ИВИ являются безболезненность, отсутствие необходимости в специальном оборудовании или стерилизации, возможность доставлять препарат непосредственно в мозг неинвазивно и быстро. В настоящее время фармакокинетика и фармакодинамика ИВИ у грызунов тщательно изучены, в том числе определены его мишени в ЦНС и оценена динамика его транспорта в периферический кровоток [12, 13]. У грызунов при хронической обработке ИВИ повышается уровень глюкозы, АТФ и фосфокреатинина в ЦНС [14], у человека ИВИ вызывает улучшение мозгового кровотока и потребления глюкозы клетками мозга [7].

При этом существующие экспериментальные данные о механизмах действия и эффективности ИВИ при ишемии головного мозга немногочисленны и ограничены в основном нашими работами, проведенными на здоровых грызунах, не имеющих коморбидных заболеваний (СД, атеросклероз), утяжеляющих последствия инсульта и повышающих предрасположенность к нему пациентов [15–20]. Имеется лишь одно исследование по изучению воздействия ИВИ на грызунах с сочетанием СД2 и ишемическим повреждением, но оно выполнено на мышах и с использованием многократного наркоза для интраназального введения, который существенно влияет на функции ЦНС, особенно в постишемический период [21]. Целью работы было исследование влияния ИВИ в различных дозах при его введе-

нии в период реперфузии на метаболические показатели и факторы воспаления у самцов крыс с СД2, подвергнутых двухсосудистой ишемии и длительной реперфузии переднего мозга, в сравнении с недиабетическими животными. Для этого проводили оценку влияния инсулина, вводимого после индукции ишемии в различных дозах, на потерю массы тела, долю жировой ткани, липидный профиль, а также на уровни глюкозы, инсулина, лептина и ряда факторов воспаления в крови диабетических и недиабетических крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы и материалы. Для интраназальных введений использовали рекомбинантный инсулин человека USP grade (USP RS, США). Хирургическое вмешательство проводили с использованием изофлурана (Karizoo, Испания). Для катетеризации бедренной артерии применяли катетер 1.0 × 0.6 × 210 мм, 23G (SciCat, Россия). Для фиксации мягких тканей и кожи использовали стерильную полиамидную антимикробную хирургическую нить для ветеринарии Polyscon № 000 (Болгария). Анализ уровня триглицеридов и общего холестерина в плазме крови проводили с помощью коммерческих наборов («НПФ АБРИС+», Россия). Определение уровня инсулина, лептина, С-реактивного белка (CRP) и фактора-α некроза опухолей (TNFα) осуществляли с использованием коммерческих ИФА-наборов (ELISA Kit for Insulin #CEA448Ra, ELISA Kit for Leptin #SEA084Ra, ELISA Kit for C Reactive Protein #SEA821Ra, High Sensitive ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha #HEA133Ra, Cloud-Clone Corp., США).

Схема эксперимента. Эксперимент включал в себя два последовательных этапа: индукция и верификация СД2 у крыс и моделирование двухсосудистой ишемии переднего мозга с длительной реперфузией (ИшР) у крыс с СД2 и без него. Были сформированы следующие экспериментальные группы ($n = 6$ в каждой группе): (1) C-SO – ложно оперированные крысы без СД2; (2) C-IR – крысы без СД2, перенесшие ИшР; (3) C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие ИшР и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; (4) DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; (5) DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие ИшР; (6) DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие ИшР и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; (7) DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие ИшР и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. ИВИ во всех случаях вводили ежедневно, на протяжении 7 дней.

Индукция сахарного диабета 2-го типа. Эксперимент проводили на самцах крыс Вистар, имевших возраст два месяца в начале эксперимента. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Моделирование СД2 проводили с помощью высокожировой диеты в течение 20 недель, через 10 недель после начала диеты проводили однократную инъекцию сравнительно низкой дозы стрептозотоцина (25 мг/кг, в/б), как описано ранее [22] (группа «DM2»). Животные контрольной группы потребляли стандартный корм (сухая кормовая смесь) и воду, вместо стрептозотоцина им вводили его растворитель (0.1 М натрий-цитратный буфер, pH 4.5) (группа «С»). Через 14 дней после инъекции стрептозотоцина проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ) для подтверждения развития СД2. В ходе ГТТ крысам вводили глюкозу (2 г/кг, в/б) и измеряли ее уровень в цельной крови до и через 15, 30, 60 и 120 мин после инъекции с помощью глюкометра и тест-полосок One Touch Ultra (США). Через 120 мин после введения глюкозы под местным наркозом забирали кровь из хвостовой вены для определения уровней инсулина и лептина. Контрольная группа также подвергалась ГТТ. Индукцию двухсосудистой ишемии переднего мозга начинали через месяц после проведения ГТТ. Перед индукцией ИшР у животных были измерены уровни общего холестерина, триглицеридов, инсулина, лептина, CRP и TNFα в плазме крови. Индекс инсулинорезистентности рассчитывали (IR) как произведение концентраций глюкозы и инсулина в крови.

Двухсосудистая ишемия переднего мозга крыс с гипотензией и последующей реперфузией [23]. Операция проводилась с использованием 2%-ного изофлуранового

наркоза. Животных помещали на подогреваемый столик, температура тела контролировалась с помощью ректального датчика температуры и поддерживалась на уровне 37 °С. Животным препарировали правую бедренную артерию и обе общие сонные артерии. Далее проводили катетеризацию бедренной артерии для индукции гипотензии путем отбора крови в шприц с раствором гепарина (100 ЕД/мл) до достижения артериального давления 40–50 мм. рт. ст. Артериальное давление измеряли при помощи прибора «Систола» (ООО «Нейроботикс»). Затем осуществляли двухстороннюю окклюзию общих сонных артерий на 10 мин для индукции церебральной ишемии. По истечении времени восстанавливали мозговой кровоток для осуществления реперфузии и вводили отобранную ранее кровь со скоростью 2 мл/мин, далее сшивали мягкие ткани. Раневую поверхность обрабатывали комбинированным антимикробным порошком «Банеоцин» (Sandoz, Австрия), швы обрабатывали антисептиком. В послеоперационный период у животных ежедневно контролировали физическое состояние, массу тела и состояние швов. В качестве контроля использовали ложнооперированных крыс, которым проводили выделение артерий, но не осуществляли гипотензию и окклюзию. Интраназальную обработку инсулином, растворенным в цитратном буфере (рН 4.5), проводили через 2 ч после окончания ишемии и далее ежедневно в 10:00 один раз в сутки до конца эксперимента, суммарно в течение 7 дней. Ложнооперированным животным интраназально вводили физиологический раствор. Интраназальное введение осуществляли в состоянии бодрствования животных. Введение инсулина или физиологического раствора проводили по каплям с помощью автоматического дозатора, при этом общий объем вводимого раствора составил 20 мкл/крыса, по 10 мкл в каждую ноздрю. На 3-и и 7-е сутки реперфузии проводили измерение массы тела, определяли уровень постпрандиальной глюкозы. На 3-и сутки реперфузии отбирали кровь из хвостовой вены под местным наркозом для определения концентрации CRP и TNF α , на 7-е сутки реперфузии забирали кровь для определения уровней инсулина (постпрандиального), триглицеридов и общего холестерина. Под постпрандиальным уровнем глюкозы и инсулина понимается значение показателей в крови, взятой у крыс через 2 ч после изъятия корма из клетки (в 8:00), корм в ночное время был в свободном доступе.

Статистический анализ проводили с помощью программы “GraphPad Prism 8.0.1”. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением и для попарных сравнений использовали *t*-критерий Стьюдента. Для сравнения двух и более независимых выборок с нормальным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ с использованием критерия Бонферрони для множественных сравнений. Для сравнения двух и более независимых выборок с ненормальным распределением применяли критерий Крускала-Уоллиса с использованием критерия Данна для множественных сравнений. Данные представлены в виде $M \pm SEM$. Достоверными считали отличия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Крысы с СД2 имели повышенные массу тела, а также повышенные уровни глюкозы (натошак), триглицеридов и общего холестерина (табл. 1). Содержание инсулина в крови (натошак) диабетических крыс достоверно не отличалось от такового у крыс, находящихся на стандартной диете, но уровень лептина у них был значимо повышен, на 64% ($p < 0.01$). По результатам ГТТ у группы DM2 была выявлена нарушенная толерантность к глюкозе, оцениваемая по значению AUC_{0-120} для глюкозной концентрационной кривой, а также были повышены уровни инсулина и лептина в крови через 120 мин после глюкозной нагрузки, что свидетельствует в пользу развития инсулиновой резистентности и сниженной чувствительности к лептину (табл. 1). Все эти метаболические и гормональные изменения являются характерными чертами СД2.

Таблица 1. Метаболические и гормональные показатели у крыс контрольной группы и у животных с СД2, вызванными длительной высокожировой диетой и инъекцией низкой дозы стрептозотоцина

Показатель	C, <i>n</i> = 18	DM2, <i>n</i> = 18
Масса тела, г	370 ± 6	452 ± 6 ^b
Глюкоза натощак, ммоль/л	5.5 ± 0.1	6.2 ± 0.2 ^b
Глюкоза (ГТТ, 120 мин), ммоль/л*	6.0 ± 2.3	10.5 ± 2.5 ^b
AUC _{0-120*} , отн. ед.	1258 ± 43	2473 ± 132 ^b
Триглицериды, ммоль/л	0.51 ± 0.01	0.92 ± 0.05 ^b
Общий холестерин, ммоль/л	1.75 ± 0.05	1.97 ± 0.06 ^b
Инсулин натощак, нг/мл	0.64 ± 0.07	0.79 ± 0.18
Лептин натощак, нг/мл	3.7 ± 0.2	6.1 ± 0.6 ^b
Инсулин (ГТТ, 120 мин), нг/мл*	0.71 ± 0.08	1.62 ± 0.32 ^{a, c}
Индекс инсулинорезистентности	3.4 ± 0.5	15.4 ± 4.1 ^b
Лептин (ГТТ, 120 мин), нг/мл*	5.3 ± 0.4	10.8 ± 0.4 ^{b, c}

C – интактные крысы без СД2; DM2 – крысы с СД2, индуцированным высокожировой диетой и инъекцией низкой дозы стрептозотоцина (25 мг/кг, в/б). * – уровни глюкозы, инсулина и лептина через 120 мин в ГТТ в группах C и DM2. ^a – различия между группами C и DM2 статистически значимы при $p < 0.05$; ^b – различия между группами C и DM2 статистически значимы при $p < 0.01$; ^c – различия между уровнями инсулина и лептина натощак и через 120 мин в ГТТ статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SEM$.

Через месяц после проведенного ГТТ крыс случайным образом делили на группы, для индукции у части животных двухсосудистой ишемии переднего мозга, которую проводили в течение 10 мин, и реперфузией в течение последующих 7 дней. В ходе эксперимента ряд показателей оценивали на 3-и и 7-е сутки реперфузии. Оценивали динамику потери массы тела у крыс с СД2 и без него после перенесенной ишемии переднего мозга на 3-и и 7-е сутки реперфузии (рис. 1). На 3-и сутки крысы групп C-IR и DM2-IR имели выраженную потерю массы тела по сравнению с ложнооперированными животными ($p < 0.01$ в обоих случаях), в то же время достоверных отличий между самими группами C-IR и DM2-IR обнаружено не было ($p = 0.086$) (рис. 1a). На 7-е сутки реперфузии у подвергшихся ишемии крыс с СД2 и без него также фиксировалась значимая потеря массы тела (рис. 1b). Оценка доли жировой ткани у крыс на 7-е сутки реперфузии показала, что в группах DM2-SO и DM2-IR доля висцерального жира была выше, чем у животных без СД2 (рис. 2a). В то же время изменения доли эпидидимального жира у диабетических животных на 7-е сутки реперфузии отсутствовали (рис. 2b).

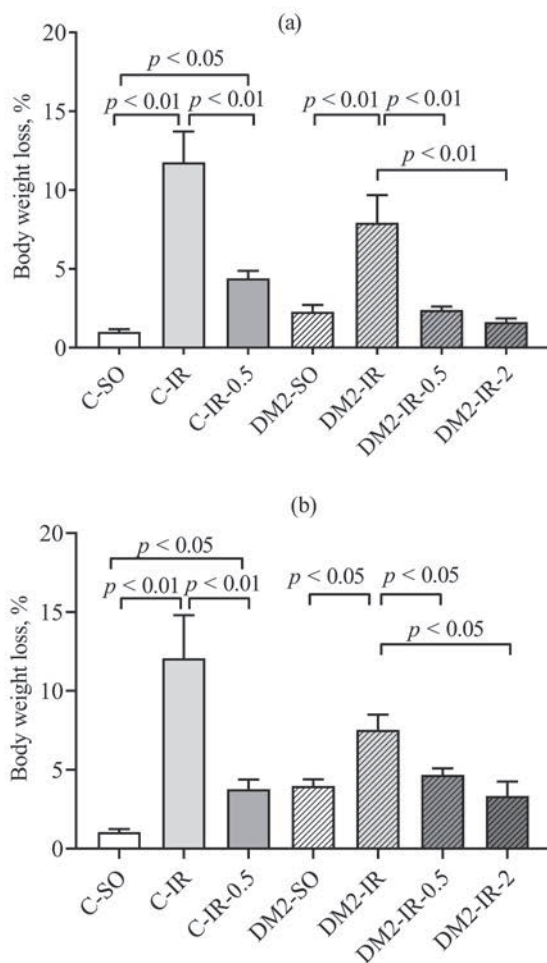


Рис. 1. Потеря массы тела у крыс с СД2 и без него, перенесших двухсосудистую ишемию и реперфузию, через 3 (а) и 7 (б) суток после начала реперфузии и влияние на нее интраназально вводимого инсулина.

Представлена потеря массы тела в% от общей массы тела на 3-и (а) и 7-е (б) сутки реперфузии. Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

Лечение ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крысу/сутки, которое начинали через 2 ч после окончания ишемии и продолжали ежедневно в течение 7 дней, снижало потерю массы тела у недиабетических животных на 3-и и 7-е сутки реперфузии ($p < 0.01$), но этот показатель оставался выше, чем в группе C-SO (рис. 1а, б). В группе C-IR-0.5 также показано повышение доли эпидидимального жира по сравнению с группой без лечения ($p < 0.05$) (рис. 2б).

Обработка СД2-крыс, перенесших ишемию переднего мозга, с помощью ИВИ в дозах 0.5 и 2 МЕ/крысу/сутки также препятствовала потере массы тела на 3-и и 7-е сутки реперфузии ($p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно) (рис. 1а, б), но не влияла на долю висцерального и эпидидимального жира (рис. 2а, б). При этом дозозависимости эффекта ИВИ на потерю массы тела у СД2-животных, перенесших ИшР, нами не было обнаружено.

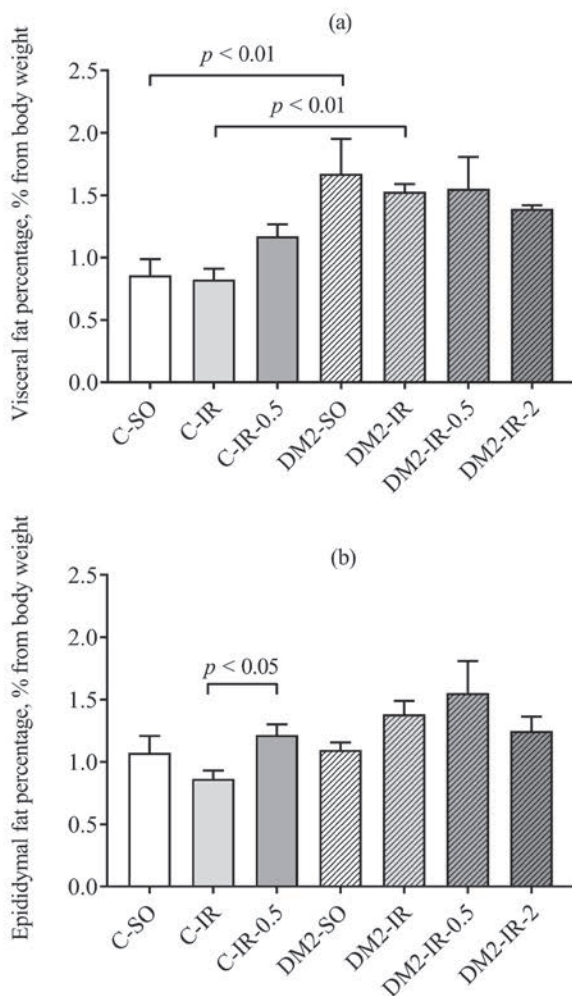


Рис. 2. Доля висцерального (а) и эпидидимального (б) жира у крыс, перенесших ишемию переднего мозга и 7-дневную реперфузию, с СД2 и без него, и влияние на них интраназально вводимого инсулина.

Представлена доля жировой ткани в % от общей массы тела. Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

На рис. 3 представлен уровень постпрандиальной глюкозы у крыс после перенесенной ИшР на 3-й и 7-е сутки реперфузии. В группах DM2-SO и DM2-IR уровень постпрандиальной глюкозы был выше по сравнению с соответствующими группами крыс без диабетической патологии, C-SO и C-IR, во всех временных точках ($p < 0.05$). В то же время различий в уровне глюкозы между группами DM2-SO и DM2-IR выявлено не было на обоих контрольных точках реперфузии.

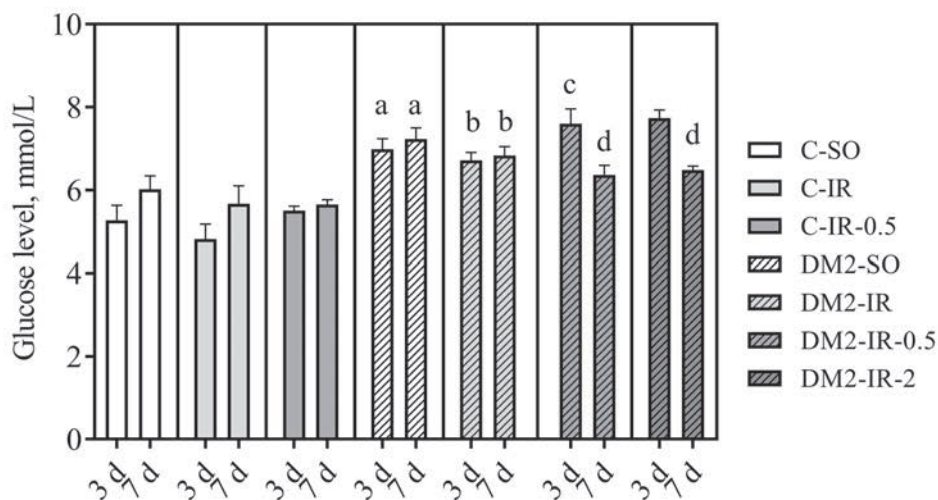


Рис. 3. Уровни постпрандиальной глюкозы в крови крыс с СД2 и без него, перенесшие ишемию переднего мозга и реперфузию, и влияние на них интраназально вводимого инсулина на 3-й и 7-й дни реперфузии.

Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки.^a – различия достоверны по сравнению с C-SO при $p < 0.05$; ^b – различия достоверны по сравнению с C-IR при $p < 0.05$; ^c – различия достоверны по сравнению с C-IR-0.5 при $p < 0.01$; ^d – различия достоверны по сравнению с соответствующим показателем на 3-й день реперфузии при $p < 0.01$. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки не оказывал значимого влияния на уровень постпрандиальной глюкозы в крови крыс без диабетической патологии, как на 3-й, так и на 7-е сутки реперфузии (рис. 3). ИВИ в дозах 0.5 и 2 МЕ/крыса/сутки, вводимый СД2-крысам, перенесшим ишемию переднего мозга, также не влиял на уровень постпрандиальной глюкозы по сравнению с группой DM2-IR. Однако при сравнении показателей на 3-й и 7-е сутки реперфузии обнаруживается достоверное снижение уровня глюкозы на 7-е сутки у СД2-крыс, получавших ИВИ в обеих исследуемых дозах ($p < 0.01$). У крыс группы DM2-IR-0.5 уровень глюкозы на 3-й сутки был повышен в сравнении с группой C-IR-0.5 ($p < 0.01$), но на 7-е сутки значимых различий обнаружено не было.

Двухсосудистая ишемия и 7-дневная реперфузия не оказывали существенного влияния на постпрандиальный уровень инсулина в контрольной группе (рис. 4). В то же время уровень инсулина повышался у крыс группы DM2-IR по сравнению с группами DM2-SO и C-IR ($p < 0.01$ в обоих случаях). Обработка ИВИ повышала уровень инсулина в крови крыс группы C-IR ($p < 0.05$). При этом в группах DM2-IR-0.5 и DM2-IR-2 отмечали значимое снижение уровня инсулина по сравнению с группой DM2-IR ($p < 0.01$ в обоих случаях) (рис. 4).

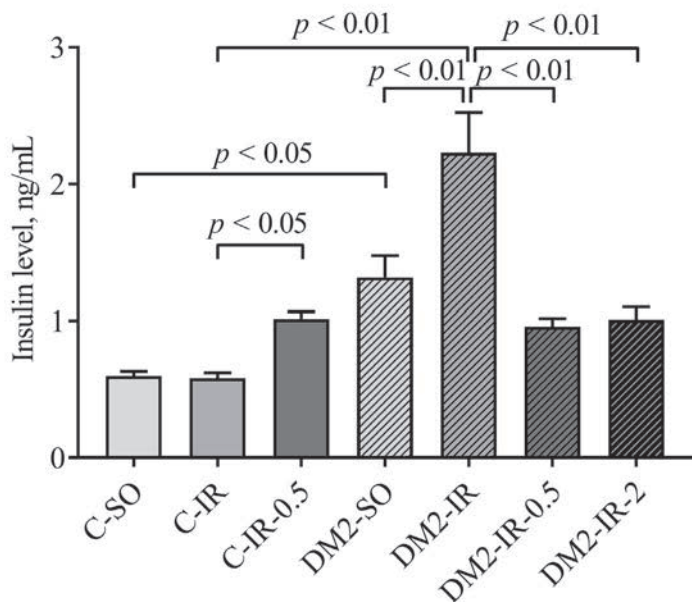


Рис. 4. Уровень постпрандиального инсулина в крови крыс с СД2 и без него, перенесшие ишемию переднего мозга и реперфузию в течение 7 суток, и влияние на него интраназально вводимого инсулина.

Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

На 7-е сутки реперфузии оценивали уровни общего холестерина и триглицеридов в крови крыс. Существенных изменений уровня общего холестерина в исследуемых группах обнаружено не было, за исключением того, что введение ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки крысам без СД2, перенесшим ишемию, приводило к повышению уровня холестерина по сравнению с группой C-SO (рис. 5а). Уровень триглицеридов на 7-е сутки реперфузии в крови в группе DM2-SO был выше, чем соответствующий показатель у крыс без СД2, а в группе DM2-IR показано его снижение по сравнению с группой DM2-SO (рис. 5б). При обработке СД2-крыс ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки отмечено повышение содержания триглицеридов в крови по сравнению с группой DM2-IR.

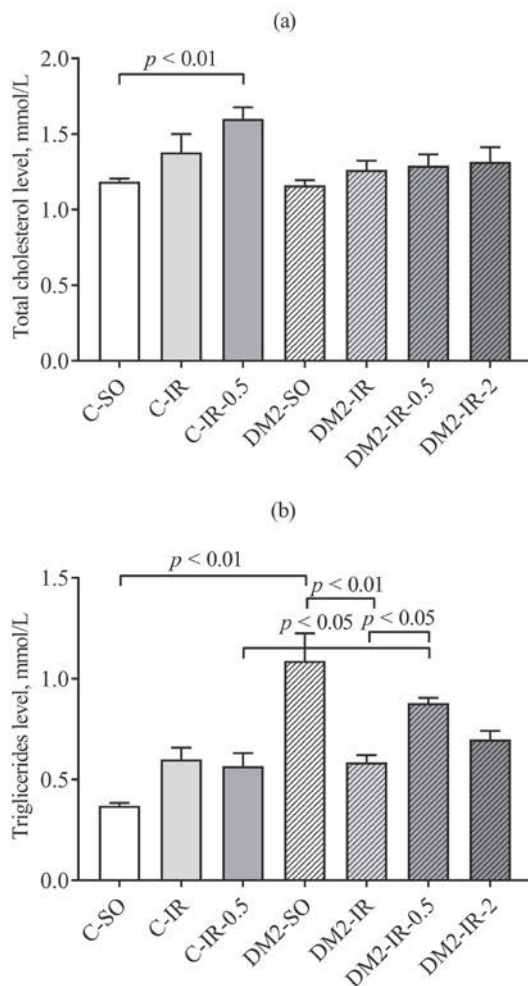


Рис. 5. Уровни общего холестерина (а) и триглицеридов (б) в крови крыс с СД2 и без него, перенесших двухсосудистую ишемию реперфузию в течение 7 суток, и влияние на них интраназально вводимого инсулина.

Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

Методом ИФА было изучено содержание CRP и TNF α в крови крыс до индукции у них ИшР и через трое суток после начала реперфузии (рис. 6а, б). По нашим данным, у крыс с СД2 отмечены повышенные базовые уровни CRP и TNF α в крови по сравнению с контрольными недиабетическими крысами ($p < 0.05$). На 3-и сутки реперфузии показано повышение уровня CRP в крови крыс группы DM2-IR по сравнению с тако-

выми в группах DM2-SO и C-IR (рис. 6b) и отмечена тенденция к повышению уровня TNF α . ИВИ не оказывал выраженного влияния на уровни CRP и TNF α в крови крыс без СД2. Ежедневная обработка СД2-крыс с помощью ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки снижала уровень CRP по сравнению с группой DM2-IR до его уровня у крыс группы DM2-SO. При этом изменений уровня TNF α при этой дозе обнаружено не было, тогда как введение ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки снижало содержание TNF α на 3-и сутки реперфузии (рис. 6a).

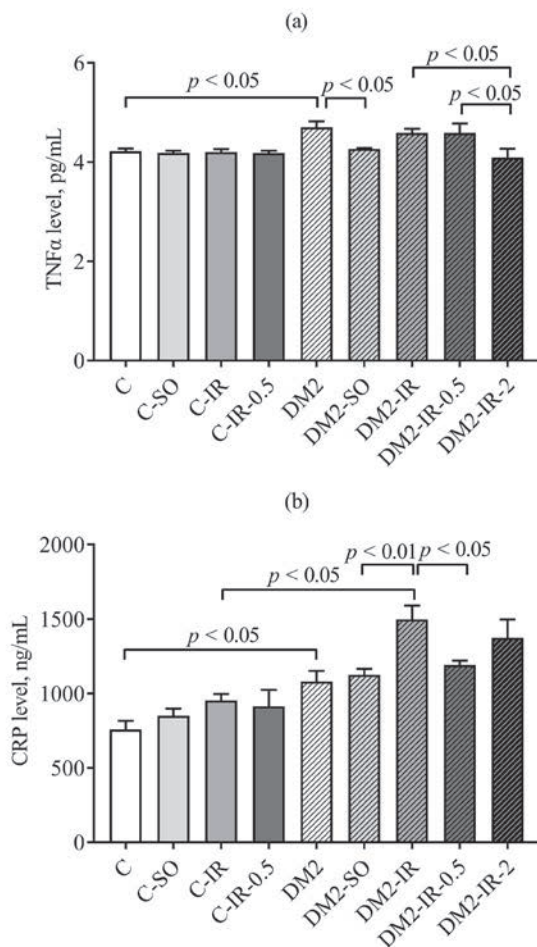


Рис. 6. Уровни TNF α (a) и С-реактивного белка (CRP) (b) в крови крыс с СД2 и без него, перенесших двухсосудистую ишемию, на 3-и сутки реперфузии, и влияние на них интраназально вводимого инсулина.

Обозначение групп: C-SO – ложнооперированные крысы без СД2; C-IR – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; C-IR-0.5 – крысы без СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-SO – ложнооперированные крысы с СД2; DM2-IR – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию; DM2-IR-0.5 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки; DM2-IR-2 – крысы с СД2, перенесшие двухсосудистую ишемию переднего мозга и реперфузию и получавшие ИВИ в дозе 2 МЕ/крыса/сутки. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ ($n = 6$ во всех группах).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Резкое снижение кровоснабжения и энергетический дефицит в ткани мозга при ишемии приводят к запуску множества компенсаторных механизмов. Считается, что единый ответ организма на острую церебральную ишемию происходит благодаря взаимодействию нервной, иммунной и эндокринной систем. Важную роль в этом играют сигнальные каскады, активируемые широким спектром гормонов, ростовых факторов, цитокинов, наделенных свойствами нейропротекторов и нейромодуляторов [24]. Среди «отдаленных» последствий ишемии выделяют нейровоспаление, опосредованное активацией глиальных клеток и клеток иммунной системы, нарушения сосудистого русла, повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и гибель нейронов [25]. Церебральная ишемия приводит к развитию выраженных стойких изменений периферического метаболизма [26, 27].

Потеря массы тела является распространенным явлением после перенесенной ишемии мозга и влияет на исход заболевания [28], а также может служить индикатором тяжести повреждений мозга [29]. По нашим данным, крысы, перенесшие ИшР, имели значительную потерю массы тела в течение 7 дней реперфузии, как с СД2, так и без него (рис. 1), что подтверждается данными других авторов о потере массы тела у мышей с ожирением, перенесших фокальную ишемию [21]. Потеря массы тела не сопровождалась выраженным снижением доли висцерального или эпидидимального жира (рис. 2). Кроме того, не было выявлено изменений содержания общего холестерина и триглицеридов у крыс без СД2, перенесших ИшР (рис. 5). По-видимому, снижение массы тела в основном обусловлено уменьшением массы мышечной ткани. Потеря мышечной массы является серьезной проблемой у пациентов с инсультом и затрагивает различные группы мышц. Так, у пациентов с острым инсультом наблюдали уменьшение мышечной массы в течение первых двух недель после ишемического эпизода, причем дефицит мышечной массы мог сохраняться в течение нескольких лет [30, 31].

Мы предполагали, что потеря массы тела у СД2-крыс с ИшР будет более выражена, чем у недиабетических животных, однако, напротив, обнаруживалась тенденция к ее снижению в группе DM2-IR по сравнению с группой C-IR. Это может быть компенсаторным процессом, направленным на ослабление негативных последствий инсульта. Важно, что у диабетических крыс с ожирением повышен уровень триглицеридов (табл. 1), что увеличивает возможность их расходования в условиях повышения энергетических потребностей организма в постишемический период. Так, показано, что низкий уровень триглицеридов характерен для пациентов с тяжелой формой инсульта [32]. Нами продемонстрировано снижение уровня триглицеридов в группе DM2-IR до такового в контрольных группах (рис. 5b), и это, возможно, обеспечивает более мягкое снижение массы тела и отсутствие изменений доли жировой ткани в группе DM2-IR.

У животных группы DM2-IR отмечалось более чем двукратное увеличение уровня постпрандиального инсулина в крови (рис. 4). Повышение концентрации инсулина может свидетельствовать о прогрессировании инсулинорезистентности у крыс группы DM2-IR, что описано как одно из последствий церебральной ишемии [33]. Дегенерация мышечной ткани вследствие инсульта может приводить к повышению уровня аминокислот и пептидов в крови, что требует повышения уровня циркулирующего в кровотоке инсулина, наделенного анаболическим эффектом [34]. У животных с нормальной чувствительностью тканей к инсулину нет необходимости в секреции больших количеств гормона в ответ на пищевую нагрузку, а также быстрее осуществляется его дегенерация, что, как мы полагаем, объясняет отсутствие значимых изменений его уровня в группе C-IR (рис. 4). В условиях же выраженной инсулинорезистентности, характерной для СД2-крыс, секреция инсулина панкреатическими островками усиливает-

ся, а период полувыведения инсулина увеличивается, чем и может быть обусловлено продемонстрированное нами повышение уровня постпрандиального инсулина в крови крыс группы DM2-IR. Повышение уровня инсулина после ИшР у СД2-крыс может обеспечивать более эффективное снижение уровня триглицеридов, поскольку инсулин регулирует их синтез и деградацию [35], что согласуется с нашими данными о более выраженном снижении уровня триглицеридов в группе DM2-IR.

Лечение подвергшихся ИшР крыс с помощью ИВИ препятствовало потере массы тела у недиабетических и диабетических крыс (рис. 1), что может быть следствием сохранения как мышечной, так и жировой ткани [36], а также влиянием инсулина мозга на набор массы тела животными [37]. По другим данным, ИВИ при индукции фокальной ишемии у мышей с ожирением не обеспечивал сохранение массы тела, несмотря на более высокие его суточные дозы [21], и это может быть обусловлено использованием наркоза для введения инсулина животным, поскольку многократный наркоз может пагубно сказываться на функциональном состоянии организма. При обработке ИВИ была показана тенденция к повышению доли эпидидимального жира у крыс группы C-IR-0.5 (рис. 2), и это сопровождалось повышением уровня общего холестерина в крови животных группы C-IR-0.5 по сравнению с ложнооперированными крысами (рис. 5a). При обработке СД2-крыс, перенесших ИшР, ИВИ в дозе 0.5 МЕ/крысу/сутки отмечено увеличение содержания триглицеридов, снижение которого показано в группе без введения гормона (рис. 5b). Все это может указывать на активацию инсулином мозга анаболических процессов на периферии [38], которое может реализоваться, в том числе, путем регуляции функциональной активности SREBP-белков (Sterol regulatory element-binding proteins) [39].

У СД2-крыс, в том числе с ИшР, уровень постпрандиальной глюкозы оставался повышенным на всем протяжении эксперимента (рис. 3). ИВИ, как и предполагалось, не оказывал существенного влияния на уровень глюкозы у животных без СД2, но у СД2-крыс с ИшР в обеих исследуемых дозах на 7-е сутки значимо снижал концентрацию постпрандиальной глюкозы. Ранее нами было описано улучшение гликемии при лечении ИВИ животных с различными метаболическими расстройствами (подробнее см. [11]), но в условиях церебральной ишемии это было обнаружено впервые. Улучшение гликемического статуса у крыс групп DM2-IR-0.5 и DM2-IR-2 на 7-е сутки обработки ИВИ сопровождалось снижением уровня инсулина в крови (рис. 4), что может свидетельствовать об улучшении толерантности к глюкозе и снижении инсулинорезистентности, и показано нами впервые в модели церебральной ишемии СД2-крыс. Другими авторами продемонстрировано увеличение потребления глюкозы мозгом крыс, получавших ежедневно ИВИ, после перенесенной травмы мозга, что указывает на стимулирующее влияние инсулина мозга на процесс потребления глюкозы, тем более что травматические повреждения также могут сопровождаться инсулинорезистентностью [40]. По другим данным, ИВИ в модели геморрагического инсульта снижает метаболический дистресс у мышей, уменьшая соотношение лактат/пируват и повышая уровень глюкозы в спинномозговой жидкости [41].

Механизмы, с помощью которых ожирение и СД2 усугубляют повреждение головного мозга после инсульта, изучены недостаточно. Считается, что существенный вклад вносят развитие хронического воспаления низкой степени тяжести, вызывающего протромботическое состояние, а также снижение эластичности сосудистой стенки и повышение ее проницаемости вследствие гипергликемии. Результатом этого является дефицит мозгового кровообращения после инсульта, выраженное нейровоспаление и более интенсивная гибель нейронов и глиальных клеток [4]. У СД2-крыс отмечали значимое повышение базового уровня провоспалительного белка CRP и тенденцию к повышению уровня провоспалительного фактора TNF α (рис. 5). Индукция ишемии приводила к еще большему увеличению уровня CRP на 3-и сутки реперфузии. ИВИ,

который не влиял на уровень CRP у недиабетических крыс, в дозе 0.5 МЕ/крыса/сутки (но не 2 МЕ/крыса/сутки) достоверно снижал содержание этого белка в крови СД2-крыс с ИшР. Необходимо отметить, что в дозе 2 МЕ/крыса/сутки (но не 0.5 МЕ/крыса/сутки) ИВИ у диабетических крыс также снижал содержание в крови TNF α . Подобный эффект, по-видимому, связан с дифференцированным опосредованным влиянием различных доз ИВИ на источники этих воспалительных факторов в ЦНС и на периферии. Основным источником CRP служат гепатоциты печени. В этом отношении интересно отметить, что эффект ИВИ на уровень триглицеридов, обмен которых проходит преимущественно в печени, также обнаружен нами при использовании дозы 0.5 МЕ/крыса/сутки, которая была эффективной при ингибировании продукции CRP. Фактор TNF α продуцируется во множестве тканей, включая ЦНС и иммунную систему, и является важнейшим маркером тяжести ишемических повреждений мозга [42]. Имеется работа об эффективности ИВИ в отношении снижения уровня TNF α , а также ряда других провоспалительных цитокинов, у мышей с моделью геморрагического инсульта [41]. В другой работе показано, что внутривенные инъекции инсулина после индукции ишемии снижают уровень воспаления и содержание TNF α в крови диабетических крыс (стрептозотоцин-индуцированный СД1, 50 мг/кг, в/б) [43]. Однако данные о влиянии ИВИ на продукцию TNF α при других формах ишемических повреждений мозга в сочетании с метаболической патологией отсутствуют, как и мало известно о механизмах действия инсулина мозга на продукцию провоспалительных цитокинов в мозге и периферических тканях при ИшР. Имеются основания считать, что в этих процессах в различной степени задействованы активируемые инсулином сигнальные пути, включающие в качестве эффекторных компонентов Акт-киназу, киназы семейства ERK1/2, комплекс mTORC, обеспечивающие выживаемость клеток и повышающие регенеративные способности тканей в постинсультный период [8, 44].

Таким образом, нами исследована возможность применения ИВИ после индукции двухсосудистой ишемии переднего мозга у крыс с длительной реперфузией как с СД2, так и без диабетической патологии. Впервые описаны положительные эффекты ИВИ при сочетанной патологии, что указывает на эффективность его использования при введении препарата через 2 ч после индукции ишемии с последующим недельным курсом ИВИ. Действуя через инсулиновую систему мозга, ИВИ индуцирует анаболические эффекты на периферии, повышая содержание общего холестерина и долю эпидидимального жира у недиабетических крыс после перенесенной ИшР. Одним из ключевых эффектов ИВИ является предотвращение потери массы тела у животных, происходящей при ИшР. При индукции ИшР у диабетических крыс инсулин при интраназальном введении улучшает толерантность к глюкозе и оказывает противовоспалительное действие. Полученные результаты открывают широкие перспективы для дальнейшего изучения терапевтического потенциала различных доз ИВИ при ИшР, осложненной метаболическими расстройствами, а также для изучения центральных механизмов действия ИВИ при церебральной ишемии, в том числе в сочетании с СД2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Моделирование двухсосудистой ишемии мозга крысы проводилось на базе Центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН (ЦКП ИЭФБ РАН). <https://www.iephb.ru/czentr-kollektivnogo-polzovaniya/>

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 23–75–01083). 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, протокол № 8–1/2023 от 24 августа 2023 года.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Какорина ЕП, Никитина СЮ* (2019) Особенности структуры смертности в Российской Федерации. Пробл соц защиты населения в истории медицины 27: 822–826. [*Kakorina EP, Nikitina SY* (2019) Features of the structure of mortality in Russian Federation. Probl Sots Gig Zdravookhran Istor Med 27: 822–826. (In Russ)].
<https://doi.org/10.32687/0869–866X-2019–27–5–822–826>
2. *Vorotnikov AV, Stafeev IS, Menshikov MY, Shestakova MV, Parfyonova YV* (2019) Latent Inflammation and Defect in Adipocyte Renewal as a Mechanism of Obesity-Associated Insulin Resistance. *Biochemistry (Mosc)* 84: 1329–1345.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919110099>
3. *Kim H, Lee H* (2023) Risk of Stroke and Cardiovascular Disease According to Diabetes Mellitus Status. *West J Nurs Res* 45: 520–527.
<https://doi.org/10.1177/01939459231158212>
4. *Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Papamikroulis GA, Vogiatzi G, Papaioannou S, Deftereos S, Tousoulis D* (2019) The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol* 14: 50–59.
<https://doi.org/10.15420/ecr.2018.33.1>
5. *Акжигитов РГ* (ред) (2021) Федеральные клинические рекомендации по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторной ишемической атакой у взрослых. М. Атомиздат. [*Akzhigitov RG* (ed) (2021) Federal recommendations for the management of patients with ischemic stroke and transient ischemic attack in adults. M. Atomizdat. (In Russ)].
6. *Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, Biller J, Brown M, Demerschalk BM, Hoh B, Jauch EC, Kidwell CS, Leslie-Mazwi TM, Oybiagele B, Scott PA, Sheth KN, Southerland AM, Summers DV, Tirschwell DL* (2019) Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 50: e344–e418.
<https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000211>
7. *Hallschmid M* (2021) Intranasal insulin. *J Neuroendocrinol* 33: e12934.
<https://doi.org/10.1111/jne.12934>
8. *Zorina II, Avrova NF, Zhakharova IO, Shpakov AO* (2023) Prospects for the Use of Intranasally Administered Insulin and Insulin-Like Growth Factor-1 in Cerebral Ischemia. *Biochemistry (Mosc)* 88: 374–391.
<https://doi.org/10.1134/S0006297923030070>
9. *White MF, Kahn CR* (2021) Insulin action at a molecular level – 100 years of progress. *Mol Metab* 52: 101304.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101304>
10. *Novak V, Mantzoros CS, Novak P, McGlinchey R, Dai W, Lioutas V, Buss S, Fortier CB, Khan F, Aponte Becerra L, Ngo LH* (2022) MemAID: Memory advancement with intranasal insulin vs. placebo in type 2 diabetes and control participants: a randomized clinical trial. *J Neurol* 269: 4817–4835.
<https://doi.org/10.1007/s00415–022–11119–6>

11. *Shpakov AO, Zorina II, Derkach KV* (2022) Hot Spots for the Use of Intranasal Insulin: Cerebral Ischemia, Brain Injury, Diabetes Mellitus, Endocrine Disorders and Postoperative Delirium. *Int J Mol Sci* 24: 3278.
<https://doi.org/10.3390/ijms24043278>
12. *Picone P, Sabatino MA, Ditta LA, Amato A, San Biagio PL, Mulè F, Giacomazza D, Dispenza C, Di Carlo M* (2018) Nose-to-brain delivery of insulin enhanced by a nanogel carrier. *J Control Release* 270: 23–36.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.040>
13. *Fan LW, Carter K, Bhatt A, Pang Y* (2019) Rapid transport of insulin to the brain following intranasal administration in rats. *Neural Regen Res* 14: 1046–1051.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.250624>
14. *Nedelcovych MT, Gadiano AJ, Wu Y, Manning AA, Thomas AG, Khuder SS, Yoo SW, Xu J, McArthur JC, Haughey NJ, Volsky DJ, Rais R, Shusher BS* (2018) Pharmacokinetics of Intranasal versus Subcutaneous Insulin in the Mouse. *ACS Chem Neurosci* 9: 809–816.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00434>
15. *Xu LB, Huang HD, Zhao M, Zhu GC, Xu Z* (2021) Intranasal Insulin Treatment Attenuates Metabolic Distress and Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Neurocrit Care* 2021 34: 154–166.
<https://doi.org/10.1007/s12028-020-01011-4>
16. *Zhu Y, Huang Y, Yang J, Tu R, Zhang X, He WW, Hou CY, Wang XM, Yu JM, Jiang GH* (2022) Intranasal insulin ameliorates neurological impairment after intracerebral hemorrhage in mice. *Neural Regen Res* 17: 210–216.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.314320>
17. *Zorina II, Zakharova IO, Bayunova LV, Avrova NF* (2018) Insulin Administration Prevents Accumulation of Conjugated Dienes and Trienes and Inactivation of Na⁺, K⁺-ATPase in the Rat Cerebral Cortex during Two-Vessel Forebrain Ischemia and Reperfusion. *J Evol Biochem Phys* 54: 246–249.
<https://doi.org/10.1134/S0022093018030109>
18. *Zorina II, Galkina OV, Bayunova LV, Zakharova IO* (2019) Effect of Insulin on Lipid Peroxidation and Glutathione Levels in a Two-Vessel Occlusion Model of Rat Forebrain Ischemia Followed by Reperfusion. *J Evol Biochem Phys* 55: 333–335.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019040094>
19. *Zakharova IO, Bayunova LV, Zorina II, Sokolova TV, Shpakov AO, Avrova NF* (2021) Insulin and α -Tocopherol Enhance the Protective Effect of Each Other on Brain Cortical Neurons under Oxidative Stress Conditions and in Rat Two-Vessel Forebrain Ischemia/Reperfusion Injury. *Int J Mol Sci* 22: 11768.
<https://doi.org/10.3390/ijms222111768>
20. *Захарова ИО, Баюнова ЛВ, Зорина ИИ, Шпаков АО, Аврова НФ* (2022) Инсулин и ганглиозиды мозга предотвращают нарушения метаболизма, вызванные активацией свободно-радикальных реакций, при двухсосудистой ишемии переднего мозга крыс и реперфузии. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(2): 262–278. [*Zakharova IO, Bayunova LV, Zorina II, Shpakov AO, Avrova NF* (2022) Insulin and Brain Gangliosides Prevent Metabolic Disorders Caused by Activation of Free Radical Reactions after Two-Vessel Ischemia–Reperfusion Injury to the Rat Forebrain. *Rus Phiziol J* 108(2): 262–278. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S086981392202011X>
21. *Smith CJ, Sims S-K, Nguyen S, Williams A, McLeod T, Sims-Robinson C* (2023) Intranasal insulin helps overcome brain insulin deficiency and improves survival and post-stroke cognitive impairment in male mice. *J Neurosci Res* 101: 1757–1769.
<https://doi.org/10.1002/jnr.25237>
22. *Bakhtyukov 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: 198.
<https://doi.org/10.3390/ijms23010198>
23. *Raval AP, Liu C, Hu BR* (2009) Rat Model of Global Cerebral Ischemia: The Two-Vessel Occlusion (2VO) Model of Forebrain Ischemia. In: Chen J, Xu ZC, Xu XM, Zhang JH (eds) *Animal Models of Acute Neurological Injuries*. Springer Protocols Handbooks. Hum Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-185-1_7
24. *Qin C, Yang S, Chu YH, Zhang H, Pang XW, Chen L, Zhou LQ, Chen M, Tian DS, Wang W* (2022) Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 7: 215.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01064-1>

25. *Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF* (2017) Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci* 38: 1167–1186.
<https://doi.org/10.1007/s10072-017-2938-1>
26. *Sidorov EV, Rout M, Xu C, Jordan L, Fields E, Apple B, Smith K, Gordon D, Chainakul J, Sanghera DK* (2023) Difference in acute and chronic stage ischemic stroke metabolic markers with controls. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 32: 107211.
<https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2023.107211>
27. *Haley MJ, White CS, Roberts D, O'Toole K, Cunningham CJ, Rivers-Auty J, O'Boyle C, Lane C, Heaney O, Allan SM, Lawrence CB* (2020) Stroke Induces Prolonged Changes in Lipid Metabolism, the Liver and Body Composition in Mice. *Transl Stroke Res* 11: 837–850.
<https://doi.org/10.1007/s12975-019-00763-2>
28. *Scherbakov N, Pietrock C, Sandek A, Ebner N, Valentova M, Springer J, Schefold JC, von Haehling S, Anker SD, Norman K, Haeusler KG, Doehner W* (2019) Body weight changes and incidence of cachexia after stroke. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 10: 611–620.
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12400>
29. *Cai L, Geng X, Hussain M, Liu Z, Gao Z, Liu S, Du H, Ji X, Ding Y* (2015) Weight loss: indication of brain damage and effect of combined normobaric oxygen and ethanol therapy after stroke. *Neurol Res* 37: 441–446.
<https://doi.org/10.1179/1743132815Y.0000000003>
30. *English C, McLennan H, Thoirs K, Coates A, Bernhardt J* (2010) Loss of skeletal muscle mass after stroke: a systematic review. *Int J Stroke* 5: 395–402.
<https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2010.00467>
31. *Gungor L, Arsva EM, Guler A, Togay Isikay C, Aykac O, Batur Caglayan HZ, Kozak HH, Aydingoz U, Topcuoglu MA* (2023) MASS investigators. Determinants of in-hospital muscle loss in acute ischemic stroke – Results of the Muscle Assessment in Stroke Study (MASS). *Clin Nutr* 42: 431–439.
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.01.017>
32. *Akhtar N, Singh R, Kamran S, Joseph S, Morgan D, Uy RT, Treit S, Shuaib A* (2024) Association between serum triglycerides and stroke type, severity, and prognosis. Analysis in 6558 patients. *BMC Neurol* 24: 88.
<https://doi.org/10.1186/s12883-024-03572-9>
33. *Ding PF, Zhang HS, Wang J, Gao YY, Mao JN, Hang CH, Li W* (2022) Insulin resistance in ischemic stroke: Mechanisms and therapeutic approaches. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 1092431.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1092431>
34. *Grizard J, Dardevet D, Balage M, Larbaud D, Sinaud S, Savary I, Grzelkowska K, Rochon C, Tauveron I, Obled C* (1999) Insulin action on skeletal muscle protein metabolism during catabolic states. *Reprod Nutr Dev* 39: 61–74.
<https://doi.org/10.1051/rnd:19990104>
35. *Ho-Palma AC, Toro P, Rotondo F, Romero MDM, Alemany M, Remesar X, Fernández-López JA* (2019) Insulin Controls Triacylglycerol Synthesis through Control of Glycerol Metabolism and Despite Increased Lipogenesis. *Nutrients* 11: 513.
<https://doi.org/10.3390/nu11030513>
36. *Katsiki N, Mikhailidis DP, Gotzamani-Psarrakou A, Didangelos TP, Yovos JG, Karamitsos DT* (2011) Effects of improving glycemic control with insulin on leptin, adiponectin, ghrelin and neuropeptide levels in patients with type 2 diabetes mellitus: a pilot study. *Open Cardiovasc Med J* 5: 136–147.
<https://doi.org/10.2174/1874192401105010136>
37. *Hallschmid M, Higgs S, Thienel M, Ott V, Lehnert H* (2012) Postprandial administration of intranasal insulin intensifies satiety and reduces intake of palatable snacks in women. *Diabetes* 61: 782–789.
<https://doi.org/10.2337/db11-1390>
38. *Scherer T, Sakamoto K, Buettner C* (2021) Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nat Rev Endocrinol* 17: 468–483.
<https://doi.org/10.1038/s41574-021-00498-x>
39. *Xiao X, Luo Y, Peng D* (2022) Updated Understanding of the Crosstalk Between Glucose/Insulin and Cholesterol Metabolism. *Front Cardiovasc Med* 9: 879355.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.879355>
40. *Brabazon F, Wilson CM, Jaiswal S, Reed J, Frey WH, Nd, Byrnes KR* (2017) Intranasal insulin treatment of an experimental model of moderate traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 37: 3203–3218.
<https://doi.org/10.1177/0271678X16685106>

41. Xu LB, Huang HD, Zhao M, Zhu GC, Xu Z (2021) Intranasal Insulin Treatment Attenuates Metabolic Distress and Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Neurocrit Care* 34: 154–166.
<https://doi.org/10.1007/s12028-020-01011-4>
42. Xue Y, Zeng X, Tu WJ, Zhao J (2022) Tumor Necrosis Factor- α : The Next Marker of Stroke. *Dis Markers* 2022: 2395269.
<https://doi.org/10.1155/2022/2395269>
43. Collino M, Aragno M, Castiglia S, Tomasini C, Thiemermann C, Boccuzzi G, Fantozzi R (2009) Insulin reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in the hippocampus of diabetic rats: a role for glycogen synthase kinase-3 β . *Diabetes* 58: 235–242.
<https://doi.org/10.2337/db08-0691>
44. Lioutas VA, Novak V (2016) Intranasal insulin neuroprotection in ischemic stroke. *Neural Regen Res* 11: 400–401.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.179040>

Effect of Intranasally Administered Insulin on Metabolic Parameters and Inflammation Factors in Control and Diabetic Rats under Conditions of Cerebral Ischemia and Reperfusion

I. I. Zorina^a, A. S. Pechalnova^a, E. E. Chernenko^a, K. V. Derkach^a, and A. O. Shpakov^a

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

The search for natural biologically active substances that have a neuroprotective effect on cerebral ischemia-reperfusion is one of the urgent problems of modern neuroscience and medicine. Intranasally administered insulin (IAI) has a pronounced restorative effect on various neurodegenerative diseases, but the mechanisms of its action and therapeutic effects in cerebral ischemia have not been studied well, including in type 2 diabetes mellitus (DM2), which increases the risk of cerebrovascular dysfunction. The aim of the work was to study the effect of IAI on metabolic parameters and inflammatory factors in male rats with DM2 subjected to the two-vessel ischemia and prolonged forebrain reperfusion, in comparison with non-diabetic animals. A long-term high-fat diet with an injection of a low dose of streptozotocin (25 mg/kg) to rats was used to induce DM2, and a model of the global forebrain two-vessel ischemia induced by occlusion of both common carotids with prolonged reperfusion (IR) for 7 days was used to study cerebral ischemia. Two hours after the end of ischemia, rats were treated with IAI at a dose of 0.5 or 2.0 IU/rat, after which the drug was administered in the same doses daily for 7 subsequent days. It was found that IAI prevents body weight loss in both nondiabetic and diabetic rats that underwent IR, and also increases the total cholesterol level and the proportion of epididymal fat in rats without DM2 after IR. In DM2 rats that underwent IR, IAI in the explored doses reduces the level of postprandial glucose and insulin content in the blood, which indicates an improvement of glucose tolerance, and also reduces the levels of inflammatory factors in the blood – C-reactive protein (at a dose of 0.5 IU/rat/day) and tumor necrosis factor- α (in a dose of 2 IU/rat/day), which reveals its anti-inflammatory potential. Thus, the course treatment with IAI after induction of cerebral ischemia followed by reperfusion leads to an improvement of metabolic parameters and weakens inflammatory reactions in rats with DM2, which may be in demand in the correction of ischemic stroke in patients with DM2.

Keywords: brain ischemia, intranasal insulin, diabetes mellitus type 2, inflammation

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ГРЕЛИНА НА СПАЙКОВУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА КРЫСЫ

© 2024 г. А. Н. Инюшкин, А. Ю. Шарафутдинова, Е. М. Инюшкина,
А. А. Инюшкин*

Самарский национальный исследовательский университет им. академика

С. П. Королева, Самара, Россия

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

Поступила в редакцию 16.04.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принята к публикации 16.05.2024 г.

В одном из важнейших нефотических механизмов синхронизации циркадианных биологических часов супрахиазматического ядра гипоталамуса с внешним геофизическим 24-часовым ритмом используется информация о режиме питания, составе и калорийности пищи. В рамках данного механизма потенциальным носителем сигнала является гормон грелин – продукт нейроэндокринных париетальных клеток слизистой оболочки желудка. В экспериментах на сагиттальных срезах гипоталамуса крыс-самцов Вистар изучали влияние 25 нМ грелина на уровень спайковой активности и параметры спайкового кодирования информации нейронами супрахиазматического ядра. Аппликации грелина приводили к росту частоты спайков и снижению энтропии распределения межспайковых интервалов у 32.1% зарегистрированных нейронов. У 29.6% клеток наблюдались реакции противоположной направленности, в виде снижения активности и роста энтропии распределения межспайковых интервалов. Показатели спайковой активности остальных 38.3% нейронов супрахиазматического ядра не изменялись. Наблюдавшиеся изменения энтропии распределения межспайковых интервалов свидетельствуют о соответствующих изменениях степени нерегулярности межспайковых интервалов под влиянием грелина. Аппликация селективного высокоаффинного антагониста GHS-R1a рецептора JMV 2959 (100 нМ) не приводила к изменениям исследуемых параметров спайковой активности, однако она полностью предотвращала изменения частоты спайков и энтропии распределения межспайковых интервалов, возникавшие в присутствии грелина. Полученные данные показывают, что гормон грелин при непосредственном воздействии на супрахиазматическое ядро *in vitro* оказывает модулирующее влияние на уровень активности и спайковый код относительно многочисленной популяции нейронов этого ядра, причем обнаруженные эффекты грелина реализуются через GHS-R1a рецепторы. Результаты настоящего исследования служат дополнительным аргументом в пользу гипотезы об участии грелина в механизмах нефотической настройки циркадианных биологических часов в соответствии с выраженностью пищевой мотивации и уровнем метаболизма.

Ключевые слова: грелин, биологические часы, циркадианные ритмы, супрахиазматическое ядро, спайковая активность, спайковый код

DOI: 10.31857/S0869813924060088, EDN: BEPUHL

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общепринятым является положение о том, что все разнообразие циркадианных ритмов регулируется биологическими часами супрахиазматического ядра гипоталамуса [1, 2]. Период эндогенного циркадианного ритма осциллятора супрахиазматического ядра обычно не соответствует 24-часовой продолжительности суток, в связи с чем нуждается в синхронизации с геофизическим суточным ритмом окружающего мира. Наряду с основным, фотическим механизмом синхронизации, основанным на афферентации от фоточувствительных ганглиозных клеток сетчатки [3], в циркадианной системе млекопитающих существуют и другие, нефотические механизмы синхронизации биологических часов. В рамках одного из них роль синхронизирующего сигнала выполняет информация о режиме питания, составе и калорийности пищи. При этом циркадианные часы регулируют суточный паттерн обмена питательных веществ и энергии, а метаболические и гормональные регуляторы являются носителями синхронизирующего сигнала обратной связи [4, 5].

Одним из биохимических регуляторов, потенциально способных принимать участие в синхронизации циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра в соответствии с пищевой мотивацией и уровнем метаболизма, является орексигенный гормон грелин. Основным местом продукции этого гормона являются нейроэндокринные париетальные клетки слизистой оболочки желудка, при этом продукция грелина растет при голодании и снижается после приема пищи [6]. В исследовании, выполненном на голодающих добровольцах, продемонстрировано, что суточный паттерн периодов роста концентрации грелина в плазме крови соответствует времени приема пищи в дни, предшествующие голоданию, при этом не было обнаружено корреляции концентрации грелина с глюкозой, инсулином и гормоном роста [7].

Из системного кровотока грелин способен проникать сквозь гематоэнцефалический барьер и непосредственно действовать на структуры гипоталамуса, при этом важную роль в транспорте грелина приписывают фенострированным капиллярам, обеспечивающим возможность его воздействия на данный отдел мозга [8]. Модуляция грелином центральных механизмов регуляции аппетита продемонстрирована в исследовании на крысах, где введение экзогенного грелина в латеральный желудочек мозга стимулировало потребление пищи дозозависимым образом [9]. Кроме этого, получены свидетельства существования центральной продукции грелина нейронами ряда ядер гипоталамуса, в частности, аркуатного, паравентрикулярного, дорсомедиального, вентромедиального ядра; менее значительный уровень продукции грелина обнаружен в супрахиазматическом ядре и в ряде экстрагипоталамических структур [10, 11].

Эффекты грелина реализуются через рецепторы секретного гормона роста GHS-R1a, относящиеся к семейству рецепторов, сопряженных с G-протеинами [12, 13]. В мозге наивысшая концентрация мРНК GHS-R1a рецепторов обнаружена в нейронах супрахиазматического, аркуатного, вентромедиального, паравентрикулярного и других ядер гипоталамуса [14–16]. Присутствие в данном списке супрахиазматического ядра указывает на возможность непосредственного влияния грелина на функцию циркадианных часов. Такая возможность подтверждена исследованием на трансгенных мышах с нокаутом грелиновых рецепторов, у которых обнаружены нарушения циркадианных ритмов локомоторной активности и питания [17]. Периферическое введение грелиномиметика GHRP-6 приводило к уменьшению фазового запаздывания циркадианного ритма, вызванного световым воздействием в ZT 13 на 45% [18], что косвенно подтверждает существование модулирующего влияния на циркадианные часы со стороны грелинергической системы. В электрофизиологической работе, выполненной на срезах гипоталамуса мышей, было продемонстрировано, что непосредственное воздействие грелина на супрахиазматическое ядро в середине

проецированного светлого времени суток (ZT 6) приводит к 3-часовому опережающему сдвигу циркадианного ритма частоты спайков и ритма экспрессии комплекса *mPER2::LUC* [19]. Вместе с тем в данной работе не содержится сведений о влиянии грелина на частоту потенциалов действия и параметры спайкового кодирования информации, существенно дополняющие характеристику биоэлектрической активности нейронов [20]. Особое внимание к спайковому кодированию информации нейронами супрахиазматического ядра обусловлено тем, что в исследовании на крысах *in vivo* [21] было продемонстрировано существование в нейронах циркадианного осциллятора суточного ритма параметров спайкового кода. До сих пор возможное влияние гормона грелина на спайковую активность и спайковый код нейронов циркадианного осциллятора оставалось неизученным. При этом известно о способности других гормонов и нейропептидов, участвующих в формировании пищевой мотивации, в частности, лептина, нейропептида Y, орексина модулировать параметры спайковой активности клеток супрахиазматического ядра [22–24].

В настоящей работе, выполненной на срезах гипоталамуса крыс, изучены особенности влияния грелина на спайковую активность и параметры спайкового кода нейронов супрахиазматического ядра и установлено, что эффекты грелина реализуются через рецепторы секретагога гормона роста GHS-R1a.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 37 крысах-самцах Вистар массой тела 80–140 г. Крысы содержались в виварии при режиме освещения в виде регулярной смены 12-часовых светлых и темных периодов и имели свободный доступ к воде и пище.

В начале эксперимента животных наркотизировали уретаном (Sigma-Aldrich, США, 1.2 г/кг массы тела внутривенно) и декапитировали. Из полости черепа быстро извлекали головной мозг и охлаждали в искусственной цереброспинальной жидкости (иЦСЖ) при температуре 1–3 °С. С помощью вибратора (NVSL, World Precision Instruments, США) готовили сагиттальные срезы гипоталамуса толщиной 300 мкм, включавшие супрахиазматическое ядро. Состав иЦСЖ был следующим (мМ): 124 NaCl, 25 NaHCO₃, 3 KCl, 1,5 CaCl₂, 1 MgSO₄, 0,5 NaH₂PO₄, 10 глюкозы. Приготовленные срезы инкубировали в насыщенном карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂) иЦСЖ по меньшей мере в течение часа при температуре 37 °С до начала регистрации. Регистрацию активности нейронов в срезах производили в камере из органического стекла при температуре 27–30 °С. Ложе для срезов, выполненное из полиэтиленовой сетки, находилось приблизительно на 0.5 см выше дна камеры, что позволяло перфузионному раствору равномерно омывать обе поверхности среза. В камере срезы фиксировали с помощью 5 параллельных 20 мкм нейлоновых нитей, натянутых на плоскую П-образную рамку из нержавеющей стали. Во время регистрации срезы перфузировали иЦСЖ, насыщенным карбогеном, с постоянной скоростью 1.5 мл/мин с помощью перистальтической помпы (Minipuls 3, Gilson, Франция).

Спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра регистрировали внеклеточно с помощью стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика около 1 мкм, заполненных иЦСЖ того же состава. Сигнал от микроэлектрода усиливали (Dagan 2400A, США), устраняли шум частотой 50 Гц (Hum Bug; Quest Scientific, Канада), оцифровывали (Micro 1401, CED, Великобритания) и подавали на персональный компьютер. Для визуализации, хранения и первичной обработки данных использовался программный пакет Spike 2 (CED, Великобритания).

В первой серии экспериментов регистрировали изменения параметров спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра ($n = 81$) на аппликации 25 нМ грелина (Merck) в перфузионный раствор. Концентрацию грелина выбирали на основании данных литературы о значении EC₅₀ при взаимодействии данного вещества

со специфическими рецепторами GHS-R1a [25]. Регистрацию активности нейронов производили в светлое время суток (в период с ZT 4 до ZT 12; где ZT 0 соответствует моменту включения освещения в виварии). После появления спайковой активности нейрона в исходном состоянии, в течение 10 мин наблюдали за стабильностью частоты потенциалов действия. При отсутствии заметной тенденции к нарушению постоянства этого показателя перфузию меняли на раствор того же состава с добавлением грелина на 10 мин, а затем возвращались к исходному раствору на 15 мин для «отмывания» среза от исследуемого вещества. С целью исключения возможной десенситизации, к каждому срезу всегда производили однократную аппликацию грелина.

Для оценки эффектов грелина сравнивали значение параметров спайковой активности в течение двух пятиминутных интервалов времени: в исходном состоянии (непосредственно перед аппликацией), и в конце периода аппликации. Нейронами, реагирующими на воздействие, считались лишь те, у которых частота спайков изменялась под влиянием грелина не менее, чем на 20% от исходной [22]. Для определения степени восстановления спайковой активности анализировали ее параметры в течение заключительного пятиминутного периода «отмывания» среза и сравнивали с исходной активностью.

Экспериментальный протокол второй серии опытов, выполненной на 22 нейронах супрахиазматического ядра, отличался тем, что после первоначальной 10-минутной регистрации активности нейрона в исходном состоянии производили 20-минутную аппликацию в перфузионный раствор 100 нМ JMV 2959 (Merck) – антагониста рецептора секреторного гормона роста GHS-R1a. При выборе концентрации антагониста опирались на данные об IC₅₀ [13]. Через 10 мин после начала действия антагониста в перфузионный раствор дополнительно апплицировали 25 нМ грелина на 10 мин, так что в течение этого периода грелин и антагонист действовали одновременно. После этого возвращались к перфузии и ЦСЖ на 15 мин в попытке «отмывания» среза от исследуемых веществ.

Первичную обработку зарегистрированных нейронограмм производили с помощью компьютерной программы LabSpike [26]. Использование программы позволяло тщательно выделить все зарегистрированные спайки из шума и артефактов, а также убедиться, что источником всех зарегистрированных спайков является один и тот же нейрон. После этого рассчитывали значение параметров спайковой активности. При этом наряду с расчётом основного «традиционного» параметра электрической активности – частоты спайков (Гц), вычисляли два параметра, характеризующих спайковое кодирование информации: энтропию распределения межспайковых интервалов (бит), отражающую степень нерегулярности продолжительности последних, и обоюдную информацию между сопряжёнными межспайковыми интервалами (бит), являющуюся показателем паттернирования спайковой информации. Методика расчета параметров спайковой активности была подробно описана ранее [21, 24, 26, 27].

Полученные данные подвергали статистической обработке. Для сравнения значений исследуемых показателей в исходном состоянии, в период действия веществ и заключительного «отмывания» среза использовали тест ANOVA с апостериорным тестом Стьюдента-Ньюмена-Кейлса. Сравнение значений параметров спайковой активности у нейронов разных групп выполняли с использованием теста Манна-Уитни (распределение данных в выборках отличалось от нормального). Нормальность распределения данных проверяли с помощью теста Шапиро-Уилка, однородность дисперсий – с помощью теста Левена. Статистические данные о параметрах спайковой активности, соответствующие нормальному распределению, представлены как средние арифметические $\pm$ стандартные ошибки среднего ($M \pm SEM$), в остальных случаях – как медиана и квартили: Me (Q1; Q2). Изменения исследуемых параметров считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реакции параметров спайковой активности на воздействие грелина изучены на 81 нейроне супрахиазматического ядра. В исходном состоянии частота потенциалов действия для всей группы нейронов равнялась 1.08 (0.45; 3.13) Гц, энтропия распределения межспайковых интервалов была равна 6.79 ± 0.12 бит, а обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами составляла 0.008 (0.000; 0.155) бит.

Аппликации 25 нМ грелина в перфузионный раствор вызвали изменение частоты потенциалов действия у 50 из 81 протестированного нейрона, что составило 61.7%. При этом у 26 нейронов (32.1%) реакции на воздействие грелина характеризовались ростом частоты спайков. Пример реакции на аппликацию грелина в виде повышения спайковой активности показан на рис. 1а. В этой группе нейронов ранговый тест ANOVA показал значимый рост частоты спайковой активности ($p < 0.001$), а апостериорный тест Стьюдента-Ньюмена-Кейлса выявил различия между значениями данного показателя, равнявшимися 0.66 (0.22; 1.19) Гц в исходном состоянии и 1.47 (0.45; 4.11) Гц ($p < 0.001$) на фоне действия грелина. Характерной особенностью реакций этих нейронов на аппликацию грелина было снижение энтропии распределения межспайковых интервалов ($p < 0.001$: ранговый тест ANOVA). Апостериорный тест Стьюдента-Ньюмена-Кейлса выявил различия между значениями энтропии, которая в исходном состоянии составила 7.565 (7.036; 7.772) бит, а в период действия грелина – 6.867 (6.388; 7.489) бит ($p < 0.01$). После «отмывания» среза иЦСЖ значение энтропии распределения межспайковых интервалов равнялось 6.977 (6.613; 7.489) бит и все еще не отличалось от исходного ($p < 0.05$), что указывает на неполное восстановление нерегулярности спайковой активности. Статистически значимых изменений обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами у нейронов этой группы обнаружено не было: ($p > 0.05$: ранговый тест ANOVA). Данные об изменениях параметров спайковой активности нейронов, отвечавших на воздействие грелина ростом частоты потенциалов действия ($n = 26$), представлены на рис. 2а.

Реакции нейронов противоположной направленности, в виде снижения биоэлектрической активности ($p < 0.001$: ранговый тест ANOVA) под действием 25 нМ грелина, зарегистрированы в 24 случаях из 81 (29.6%). Пример такой реакции представлен на рис. 1б. В исходном состоянии частота потенциалов действия и обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами у нейронов данной группы не имела статистически значимых различий с нейронами, показавшими рост активности под влиянием грелина ($p > 0.05$: тест Манна-Уитни). Однако, значение энтропии распределения межспайковых интервалов оказалось выше в группе нейронов, реагировавших на воздействие грелина ростом активности – 7.565 (7.036; 7.772) бит, по сравнению с нейронами, активность которых под влиянием грелина снижалась – 7.026 (6.564; 7.580) бит ($p < 0.05$: тест Манна-Уитни). Апостериорный тест Стьюдента-Ньюмена-Кейлса выявил снижение медианы частоты спайков у нейронов данной группы ($n = 24$) с 0.88 (0.30; 2.79) Гц в исходном состоянии до 0.43 (0.15; 1.76) Гц в присутствии грелина ($p < 0.001$). Одновременно со снижением уровня спайковой активности у этих нейронов при воздействии грелина наблюдалось повышение энтропии распределения межспайковых интервалов. Тест ANOVA показал значимый рост данного показателя ($p < 0.05$), а апостериорный тест Стьюдента-Ньюмена-Кейлса выявил различия между значениями энтропии в исходном состоянии (7.041 ± 0.137 бит) и на фоне действия грелина (7.286 ± 0.144 бит, $p < 0.05$). Изменений обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами обнаружено не было ($p > 0.05$: ранговый тест ANOVA). На рис. 2б представлены статистические данные об изменениях параметров спайковой активности в группе нейронов, отвечавших на воздействие грелина снижением частоты потенциалов действия ($n = 24$).

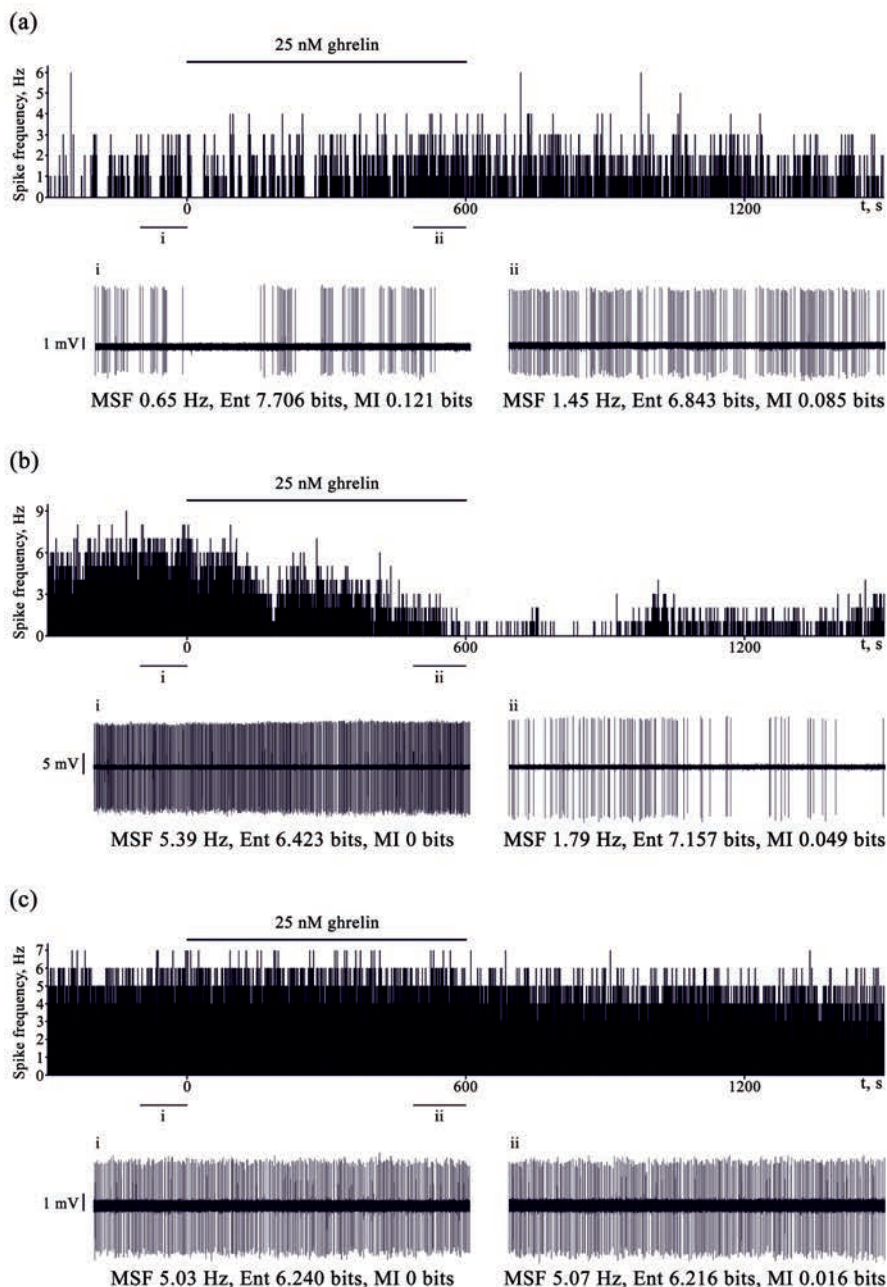


Рис. 1. Примеры реакций нейронов супрахиазматического ядра на аппликацию 25 нМ грелина в виде роста спайковой активности (а), снижения спайковой активности (б) и отсутствия существенных изменений активности (с). Для всех нейронов в верхней части рисунка представлены гистограммы с данными об изменении уровня спайковой активности клеток по ходу эксперимента. Период аппликации грелина показан горизонтальным отрезком над гистограммой. По оси абсцисс – время в секундах (момент начала аппликации соответствует 0), по оси ординат – частота спайков (Гц). Горизонтальным отрезкам под гистограммой (i, ii) соответствуют 100-секундные интервалы записи спайковой активности нейронов, представленные под гистограммой: (i) – непосредственно перед воздействием, (ii) – в конце аппликации грелина.

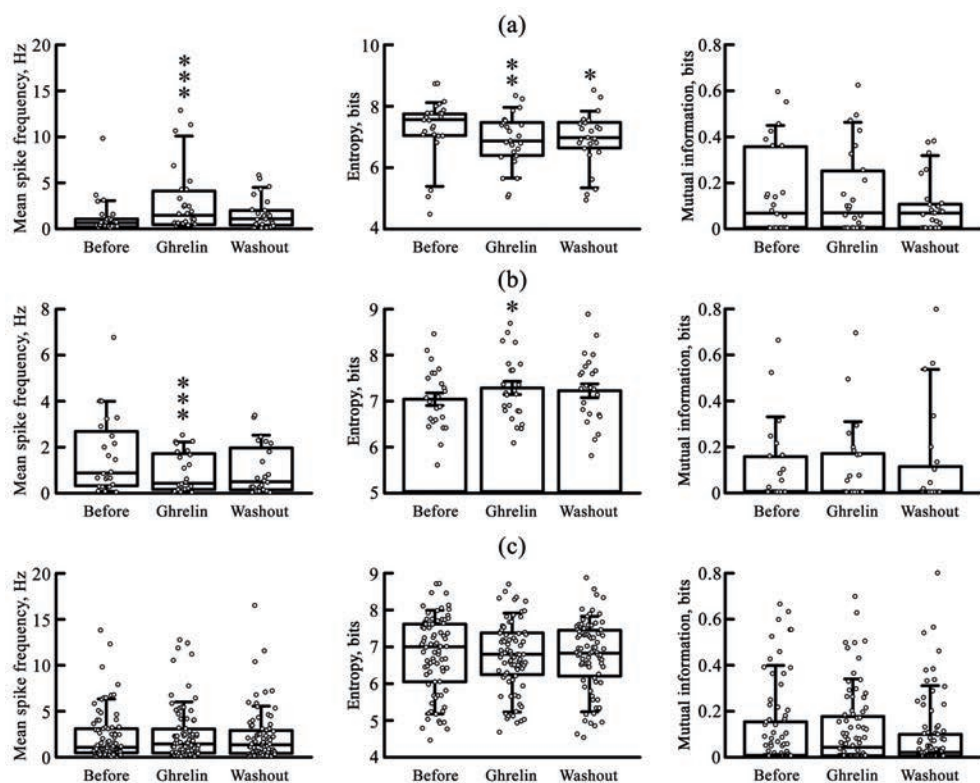


Рис. 2. Статистические данные о влиянии 25 нМ грелина на среднюю частоту потенциалов действия, Гц (левые диаграммы), энтропию распределения межспайковых интервалов, бит (средние диаграммы) и обоюдную информацию между сопряжёнными межспайковыми интервалами, бит (правые диаграммы) нейронов супрахиазматического ядра. (а) Нейроны, активность которых повышалась под влиянием грелина ($n = 26$). (б) Нейроны, активность которых снижалась под влиянием грелина ($n = 24$). (с) Вся совокупность зарегистрированных нейронов ($n = 81$). Обозначения под диаграммами: Before – исходное состояние; Ghrelin – на фоне действия грелина; Washout – после «отмывания» среза иЦСЖ. Звёздочками отмечены статистически значимые различия с исходным состоянием: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Остальные нейроны (31 из 81; 38.3%) не изменяли уровень спайковой активности в присутствии грелина ($p > 0.05$; ранговый тест ANOVA). В данной группе нейронов по ходу эксперимента также не выявлялось изменений энтропии распределения межспайковых интервалов и обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами ($p > 0.05$; ранговый тест ANOVA). Пример отсутствия реакции на воздействие 25 нМ грелина представлен на рис. 1с. Анализ реакций на воздействие грелина всех протестированных нейронов как единой группы ($n = 81$) также не выявил статистически значимых изменений частоты спайков, энтропии распределения межспайковых интервалов и обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами ($p > 0.05$; ранговый тест ANOVA), что подтверждает разнонаправленность реакций отдельных категорий нейронов внутри общей группы. Статистические данные о параметрах спайковой активности всех протестированных нейронов супрахиазматического ядра как единой группы по ходу эксперимента представлены на рис. 2с.

Поскольку активность грелина реализуется через GHS-R1a. рецепторы [25], в отдельной серии экспериментов на 22 нейронах супрахиазматического ядра изучены эффекты селективного антагониста этих рецепторов JMV 2959. Установлено, что аппликация данного антагониста в концентрации 100 нМ сама по себе не оказывает влияния на параметры спайковой активности нейронов, однако она эффективно предотвращает влияние 25 нМ грелина. Пример экспериментальной записи, представленный на рис. 3а, показывает отсутствие существенных изменений спайковой активности как в период действия антагониста, так и в период воздействия грелина на фоне JMV 2959. В данной серии экспериментов лишь в одном из 22 случаев (4.5%) зарегистрирован рост частоты спайков выше порогового уровня, принятого в настоящем исследовании ($> 20\%$) под влиянием грелина на фоне антагониста GHS-R1a рецепторов, что значительно меньше ($p < 0.05$: z-тест), чем в первой серии экспериментов (26 из 81 нейрона). Ранговый тест ANOVA не выявил существенных изменений частоты спайков, энтропии распределения межспайковых интервалов и обоюдно информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами по ходу эксперимента с использованием грелина на фоне антагониста GHS-R1a рецепторов ($p > 0.05$: ранговый тест ANOVA, $n = 22$). Статистические данные о значениях параметров спайковой активности на всех последовательных стадиях эксперимента представлены на рис. 3б. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что влияние грелина на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра реализуется через GHS-R1a рецепторы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Синхронизация циркадианного осциллятора млекопитающих, расположенного в супрахиазматическом ядре, с 24-часовым ритмом окружающего мира осуществляется с участием совокупности времязадателей. Главным среди них является суточный ритм естественного освещения, действующий в рамках фотического механизма настройки биологических часов [3]. Наряду с данным механизмом, в циркадианной системе существуют также нефотические механизмы синхронизации циркадианнных часов. В частности, важную роль в нефотической настройке биологических часов играют времязадатели, связанные с пищей, такие как суточный режим питания, состав и калорийность пищи, а также метаболические и гормональные сигналы, являющиеся носителями информации о метаболическом статусе и уровне питательных веществ [28–30]. Однако физиологический механизм пищевой синхронизации циркадианной системы остается недостаточно изученным [31]. Ранее популярная гипотеза о существовании осциллятора, настраиваемого пищей (“food entrainable oscillator”, FEO) и независимого от циркадианнных часов супрахиазматического ядра [32], не нашла достаточных экспериментальных подтверждений, поскольку локализацию такого осциллятора установить не удалось, и само существование его осталось недоказанным.

В качестве потенциального времязадателя циркадианной системы, являющегося носителем сигнала о пищевой мотивации и уровне метаболизма, рассматривается орексигенный гормон грелин. Главным местом продукции этого гормона являются нейроэндокринные клетки слизистой оболочки желудка, выработка грелина в которых растет при голодании и снижается после приема пищи [6]. Важно заметить, что суточный паттерн периодов роста концентрации грелина в плазме крови голодного человека соответствует времени приема пищи в дни, предшествующие голоданию [7]. При этом корреляции концентрации грелина с глюкозой, инсулином и гормоном роста обнаружено не было. Суточный ритм концентрации грелина в плазме крови крыс характеризуется пиком в дневное время (около ZT 5) и снижением в ночное время [33]. В промоторе гена грелина описаны многочисленные элементы E-box, известные как мишени для протеинов циркадианнных часов [34], что предполагает их участие в регуляции суточного ритма продукции грелина. У трансгенных мышей с нокаутом грели-

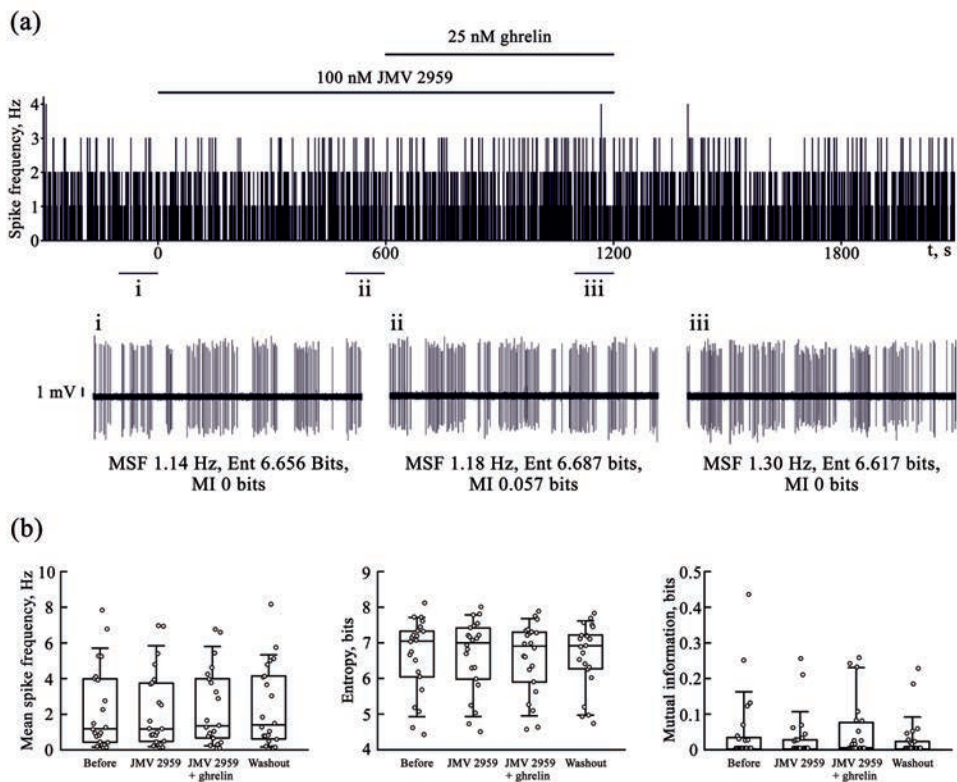


Рис. 3. Селективный антагонист GHS-R1a рецепторов JMV 2959 не оказывал влияния на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра, но предотвращал эффекты 25 нМ грелина. (а) Пример реакции нейрона на аппликацию антагониста и последующую аппликацию грелина. В верхней части рисунка представлена гистограмма с данными о частоте спайков нейрона по ходу эксперимента. Периоды аппликации антагониста и грелина показаны горизонтальными отрезками над гистограммой. По оси абсцисс – время в секундах (момент начала аппликации соответствует 0), по оси ординат – частота спайков (Гц). Горизонтальным отрезкам под гистограммой (i, ii, iii) соответствуют 100-секундные интервалы записи спайковой активности нейронов, представленные под гистограммой: (i) – непосредственно перед воздействием, (ii) – в конце аппликации антагониста, (iii) – в конце аппликации грелина на фоне действия антагониста. (б) Статистические данные о влиянии 100 нМ JMV 2959 и 25 нМ грелина на фоне действия антагониста на среднюю частоту потенциалов действия, Гц (левая диаграмма), энтропию распределения межспайковых интервалов, бит (средняя диаграмма) и обобщенную информацию между сопряженными межспайковыми интервалами, бит (правая диаграмма) нейронов ($n = 22$). Обозначения под диаграммами: Before – исходное состояние; JMV 2959 – на фоне действия антагониста; JMV 2959 + Ghrelin – на фоне совместного действия антагониста и грелина; Washout – после «отмывания» среза иЦСЖ.

новых рецепторов имеются характерные нарушения циркадианных ритмов локомоторной активности и питания [17], что указывает на непосредственное участие грелина в функции биологических часов. Это предположение подтвердилось в исследовании с периферическим введением грелиномиметика GHRP-6, которое привело к уменьшению фазового запаздывания циркадианного ритма, вызванного световым воздействием в ZT 13 на 45% [18]. Результаты анализа суточного паттерна локомоторной активности, потребления пищи, продукции грелина и экспрессии часовых генов в клетках

слизистой желудка мышей [35] позволили предположить, что эти клетки могут играть роль периферического осциллятора, настраиваемого пищей (FEO). Вместе с тем, влияние грелина на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра до сих пор оставалось практически неизученным. В единственной доступной публикации на эту тему, выполненной по итогам работы на срезах гипоталамуса мышей, было продемонстрировано, что непосредственное воздействие грелина на супрахиазматическое ядро в середине проецированного светлого времени суток (ZT 6) приводит к 3-часовому опережающему сдвигу циркадианного ритма частоты спайков и ритма экспрессии комплекса *mPER2::LUC* [19].

В настоящем электрофизиологическом исследовании изучалось влияние грелина на уровень спайковой активности и параметры спайкового кодирования информации нейронами супрахиазматического ядра крыс *in vitro*. При этом кроме частоты потенциалов действия рассчитывались энтропия распределения межспайковых интервалов и обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами, что позволило выполнить количественную оценку реакций нейронного кода на воздействие грелина. Аппликация грелина оказывала влияние на частоту спайков у 61.7% нейронов супрахиазматического ядра. Учитывая тот факт, что эффекты грелина проявлялись в экспериментах на переживающих срезах гипоталамуса, есть все основания полагать, что действие этого вещества осуществлялось через клетки супрахиазматического ядра и не зависело от его влияния на афферентные входы из экстрагипоталамических структур. Полученные данные, по всей видимости, отражают значительную в количественном отношении долю нейронов супрахиазматического ядра, осуществляющих экспрессию рецепторов, способных взаимодействовать с грелином. Такими рецепторами являются рецепторы секретного гормона роста *GHS-R1a* [12, 13], при этом супрахиазматическое ядро отличается высокой интенсивностью экспрессии этих рецепторов [14–16]. Реакции частоты спайков у нейронов супрахиазматического ядра на воздействие грелина оказались разнонаправленными: в 32.1% случаев наблюдался рост этого показателя, в 29.6% было зарегистрировано его снижение. Стоит заметить, что разнонаправленные реакции спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра зарегистрированы и при воздействии другого орексигенного пептида орексина A [22], с той разницей, что в последнем случае рост активности наблюдался в 31%, а ее снижение – в 48% случаев. Похожая разнонаправленность реакций спайковой активности наблюдалась и при воздействии грелина на нейроны соседнего аркуатного ядра гипоталамуса. В этом случае разнонаправленность реакций определялась нейрохимическим фенотипом нейронов, подвергавшихся воздействию грелина. В частности, под влиянием грелина возрастала спайковая активность нейронов, экспрессирующих нейропептид Y, транспортер дофамина (DAT) и агути-родственный пептид (AgRP), тогда как активность нейронов, продуцирующих проопиомеланокортин (POMC), снижалась [10, 36]. Супрахиазматическое ядро является в высшей степени нейрохимически гетерогенной структурой [37, 38], что может быть причиной разнообразия реакций на воздействие грелина. Другое возможное объяснение данного феномена связано с существованием в супрахиазматическом ядре локальной ГАМКергической нейронной сети, в состав которой входят практически все нейроны этого ядра [39, 40]. Если действие грелина будет осуществляться через тормозный ГАМКергический пресинаптический нейрон, характер реакции регистрируемого постсинаптического нейрона может меняться на противоположный. Стоит особо заметить, что эффекты ГАМК на уровне нейронов супрахиазматического ядра не всегда тормозные, наряду с ними здесь описано и возбуждающее влияние ГАМК [41, 42]. Наконец, различия в реакциях нейронов супрахиазматического ядра на воздействие грелина могут объясняться включением в реакцию различных каскадов внутриклеточных посредников. Взаимодействие грелина с *GHS-R1a* рецепторами вызывает стимуляцию сигнального пути фосфолипазы C, приводящую к образованию инозитолфосфата и активации протеинкиназы C, что

в свою очередь инициирует высвобождение ионов Ca^{2+} из внутриклеточного депо [43]. Одновременно активация GHS-R1a рецепторов ингибирует ионные каналы K^+ , что способствует входу внеклеточных ионов Ca^{2+} через потенциал-зависимые L-каналы. Рост концентрации ионов Ca^{2+} в клетке вызывает коактивацию CaMKK2 (кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II) и p53-Sirt1, что приводит к последующему фосфорилированию AMPK (АМФ-киназы) и к реализации эффектов грелина [44].

Поскольку информация между нейронами ЦНС передается с помощью спайкового кода [45], в настоящей работе для оценки эффектов грелина на уровне супрахиазматического ядра кроме частоты потенциалов действия использованы параметры кодирования информации, позволяющие более полно охарактеризовать реакции спайковой активности клеток. Установлено, что одновременно с изменением уровня активности нейронов под влиянием грелина происходят противоположные по направленности реакции энтропии распределения межспайковых интервалов. В группе из 26 нейронов, ответивших на воздействие грелина ростом частоты спайковой активности, наблюдалось снижение энтропии, тогда как у 24 нейронов, активность которых в присутствии грелина снижалась, энтропия повышалась. Поскольку энтропия распределения межспайковых интервалов не зависит от частоты спайков, изменения этого параметра, характеризующего степень нерегулярности потенциалов действия, представляют отдельный интерес [21]. Энтропия является параметром, особенно подходящим для характеристики спайкового кода нейронов супрахиазматического ядра, поскольку среди них часто встречаются клетки с бимодальным и полимодальным распределением межспайковых интервалов [46]. В отличие от других часто используемых параметров вариабельности (например, коэффициента вариации, стандартного отклонения), энтропия является величиной, зависящей от формы и модальности распределения межспайковых интервалов, а также от их дисперсии [27]. Таким образом, важное преимущество использования энтропии заключается в учете всех аспектов вариабельности. В то же время грелин не оказывал влияния на обоюдную информацию между сопряженными межспайковыми интервалами. Такой характер реакций свидетельствует о том, что при воздействии грелина у нейронов супрахиазматического ядра наблюдались изменения нерегулярности потенциалов действия без существенных изменений степени паттернирования спайковой информации в нейронном коде. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что грелин при непосредственном воздействии способен модулировать уровень активности и оказывать влияние на спайковый код относительно многочисленной популяции нейронов циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра.

Одной из задач исследования была экспериментальная проверка положения о том, что эффекты грелина на уровне нейронов супрахиазматического ядра реализуются через GHS-R1a рецепторы. В настоящей работе использовали селективный высокоаффинный антагонист GHS-R1a рецептора JMV 2959 [13]. Аппликация данного антагониста не приводила к реакциям исследуемых параметров спайковой активности, однако она полностью предотвращала изменения частоты спайков и энтропии распределения межспайковых интервалов, возникавшие в присутствии грелина. Эти данные свидетельствуют о том, что влияние грелина на параметры спайковой активности и спайкового кода нейронов супрахиазматического ядра реализуются через GHS-R1a рецепторы. Исследований влияния блокады GHS-R1a рецепторов на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра ранее не проводилось, однако полученные в нашей работе результаты аналогичны данным электрофизиологического исследования *in vitro* Salome с соавт. [47], выполненного на нейронах соседнего аркуатного ядра, в котором аппликация JMV 2959 не влияла на спайковую активность клеток, однако полностью предотвращала эффекты 50 нМ грелина.

В целом результаты настоящего исследования показывают, что гормон грелин при непосредственном воздействии на супрахиазматическое ядро *in vitro* оказывает модулирующее влияние на уровень активности и спайковый код относительно многочисленной популяции нейронов этого ядра. Эти эффекты грелина реализуются через

GHS-R1a рецепторы. Полученные данные указывают на участие грелина в механизмах нефотической настройки циркадианных биологических часов в соответствии с выраженностью пищевой мотивации и уровнем метаболизма.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комитета по биоэтике биологического факультета Самарского национального исследовательского университета им. академика С.П. Королева (протокол № 2018–41 от 3.10.2018 г.). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23–28–00720).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и концепция работы (А. Н. И.), планирование эксперимента (А. Н. И., Е. М. И.), сбор данных (А. Ю. Ш., А. Н. И., Е. М. И., А. А. И.), обработка данных (А. А. И., А. Н. И.), написание и редактирование манускрипта (А. Н. И., А. Ю. Ш., Е. М. И., А. А. И.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M* (2018) Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Rev Neurosci* 19: 273–278.
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z>
2. *Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M* (2019) The mammalian circadian timing system and the suprachiasmatic nucleus as its pacemaker. *Biology* 8: 13.
<https://doi.org/10.3390/biology8010013>
3. *Ashton A, Foster RG, Jagannath A* (2022) Photoc entrainment of the circadian system. *Int J Mol Sci* 23:729.
<https://doi.org/10.3390/ijms23020729>
4. *Pickel L, Sung HK* (2020) Feeding rhythms and the circadian regulation of metabolism. *Front Nutr* 7: 39.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00039>
5. *Grosjean E, Simonneaux V, Challet E* (2023) Reciprocal interactions between circadian clocks, food intake, and energy metabolism. *Biology* 12: 539.
<https://doi.org/10.3390/biology12040539>
6. *Sakata I, Sakai T* (2010) Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int J Pept* 2010: 945056.
<https://doi.org/10.1155/2010/945056>
7. *Natalucci G, Riedl S, Gleiss A, Zidek T, Frisch H* (2005) Spontaneous 24-h ghrelin secretion pattern in fasting subjects: maintenance of a meal-related pattern. *Eur J Endocrinol* 152: 845–850.
<https://doi.org/10.1530/eje.1.01919>
8. *Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdie P, Bourrier E, Dehouck B, Baneres JL, Martinez J, Mery PF, Marie J, Trinquet E, Fehrentz JA, Prevot V, Mollard P* (2013) Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1512–1517.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1212137110>

9. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194–198.
<https://doi.org/10.1038/35051587>
10. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strassburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37: 649–661.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00063-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00063-1)
11. Yi CX, van der Vliet J, Dai J, Yin G, Ru L, Buijs RM (2006) Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 147: 283–294.
<https://doi.org/10.1210/en.2005-1051>
12. Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG (2004) Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4679–4684.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0305930101>
13. Moulin A, Brunel A, Boeglin D, Demange L, Ryan J, M'Kadmi C, Denoyelle S, Martinez J, Fehrentz JA (2013) The 1,2,4-triazole as a scaffold for the design of ghrelin receptor ligands: development of JMV 2959, a potent antagonist. *Amino Acids* 44: 301–314.
<https://doi.org/10.1007/s00726-012-1355-2>
14. Mitchell V, Bouret S, Beauvillain JC, Schilling A, Perret M, Kordon C, Epelbaum J (2001) Comparative distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in *Microcebus murinus* (Primate, lemurian) and rat forebrain and pituitary. *J Comp Neurol* 429: 469–489.
[https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010115\)429:3<469::AID-CNE8>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010115)429:3<469::AID-CNE8>3.0.CO;2-%23)
15. Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494: 528–548.
<https://doi.org/10.1002/cne.20823>
16. Airapetov MI, Eresko SO, Lebedev AA, Bychkov ER, Shabanov PD (2021) Expression of the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a) in the brain. *Physiol Rep*: 9: e15113.
<https://doi.org/10.14814/phy2.15113>
17. Waddington Lamont E, Bruton J, Blum ID, Abizaid A (2014) Ghrelin receptor-knockout mice display alterations in circadian rhythms of activity and feeding under constant lighting conditions. *Eur J Neurosci* 39: 207–217.
<https://doi.org/10.1111/ejn.12390>
18. Yi CX, Challet E, Pevet P, Kalsbeek A, Escobar C, Buijs RM (2008) A circulating ghrelin mimetic attenuates light-induced phase delay of mice and light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Eur J Neurosci* 27: 1965–1972.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06181.x>
19. Yannielli PC, Molyneux PC, Harrington ME, Golombok DA (2007) Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J Neurosci* 27(11): 2890–2895.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3913-06.2007>
20. Guo W, Fouda ME, Eltaail AM, Salama KN (2021) Neural coding in spiking neural networks: a comparative study for robust neuromorphic systems. *Front Neurosci* 15: 638474.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.638474>
21. Bhumbra GS, Inyushkin AN, Saeb-Parsy K, Hon A, Dyball RED (2005) Rhythmic changes in spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Physiol* 653: 291–307.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.079848>
22. Brown TM, Coogan AN, Cutler DJ, Hughes AT, Piggins HD (2008) Electrophysiological actions of orexins on rat suprachiasmatic neurons in vitro. *Neurosci Lett* 448: 273–278.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.10.058>
23. Inyushkin AN, Bhumbra GS, Dyball RED (2009) Leptin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neuroendocrinol* 21: 705–714.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01889.x>
24. Inyushkin AN, Petrova AA, Tkacheva MA, Inyushkina EM (2017) Effects of neuropeptide Y on neuron spike activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Behav Physiol* 47: 1257–1269.
<https://doi.org/10.1007/s11055-017-0402-6>
25. Gross JD, Kim DW, Zhou Y, Jansen D, Slosky LM, Clark NB, Ray CR, Hu X, Southall N, Wang A, Xu X, Barnaeva E, Wetsel WC, Ferrer M, Marugan JJ, Caron MG, Barak LS, Toth K (2022) Discovery of a functionally selective ghrelin receptor (GHSR_{1a}) ligand for modulating brain dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119(10): e2112397119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2112397119>

26. *Bhumra GS, Inyushkin AN, Dyball RED* (2004) Assessment of spike activity in the supraoptic nucleus. *J Neuroendocrinol* 16: 390–397.
<https://doi.org/10.1111/j.0953-8194.2004.01166.x>
27. *Bhumra GS, Dyball RED* (2003) Measuring spike coding in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol* 555: 281–296.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.053264>
28. *Mistlberger RE* (2020) Food as circadian time cue for appetitive behavior. *F1000Research* 2020, 9(F1000 Faculty Rev): 61.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.20829.1>
29. *de Assis LVM, Oster H* (2021) The circadian clock and metabolic homeostasis: entangled networks. *Cell Mol Life Sci* 78: 4563–4587.
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03800-2>
30. *Chambers L, Seidler K, Barrow M* (2022) Nutritional entrainment of circadian rhythms under alignment and misalignment: A mechanistic review. *Clin Nutr ESPEN* 51: 50–71.
<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.06.010>
31. *Pendergast JS, Yamazaki S* (2018) The mysterious food-entrainable oscillator: insights from mutant and engineered mouse models. *J Biol Rhythms* 33: 458–474.
<https://doi.org/10.1177/0748730418789043>
32. *Dadivson AJ* (2006) Search for the feeding-entrainable circadian oscillator: a complex proposition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1524–R1526.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00073.2006>
33. *Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F, Krueger JM* (2004) Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1071–R1079.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00294.2004>
34. *Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K* (2004) Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 145: 4144–4153.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-1718>
35. *LeSauter J, Hoque N, Weintraub M, Pfaff DW, Silver R* (2009) Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 13582–13587.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906426106>
36. *Na J, Park BS, Jang D, Kim D, Tu TH, Ryu Y, Ha CM, Koch M, Yang S, Kim JG, Yang S* (2022) Distinct firing activities of the hypothalamic arcuate nucleus neurons to appetite hormones. *Int J Mol Sci* 23: 2609.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052609>
37. *Moore RY, Speh JC, Leak RK* (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309: 89–98.
<https://doi.org/10.1007/s00441-002-0575-2>
38. *Morin LP, Shivers KY, Blanchard JH, Muscat L* (2006) Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 137: 1285–1297.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.030>
39. *Nygard M, Palomba M* (2006) The GABAergic network in the suprachiasmatic nucleus as a key regulator of the biological clock: does it change during senescence? *Chronobiol Int* 23: 427–435.
<https://doi.org/10.1080/07420520500545938>
40. *Kwon J, Jang MW, Lee J* (2021) Retina-attached slice recording reveals light-triggered tonic GABA signaling in suprachiasmatic nucleus. *Mol Brain* 14: 171.
<https://doi.org/10.1186/s13041-021-00881-9>
41. *Albers HE, Walton JC, Gamble KL, McNeill JKIV, Hummer DL* (2016) The dynamics of GABA signaling: revelations from the circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Front Neuroendocrinol* 44: 35–82.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.11.003>
42. *Ono D, Honma KI, Honma S* (2021) GABAergic mechanisms in the suprachiasmatic nucleus that influence circadian rhythm. *J Neurochem* 157: 31–41.
<https://doi.org/10.1111/jnc.15012>
43. *Kojima M, Hosoda H, Kangawa K* (2001) Purification and distribution of ghrelin: The natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Horm Res* 51 (Suppl S1): 93–97.
<https://doi.org/10.1159/000048143>
44. *Jiao ZT, Luo Q* (2022) Molecular mechanisms and health benefits of ghrelin: A narrative review. *Nutrients* 14: 4191.
<https://doi.org/10.3390/nu14194191>

45. *Campo AT* (2020) Inferring neural information flow from spiking data. *Comput Struct Biotechnol J* 18: 2699–2708.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.007>
46. *Saeb-Parsy K, Dyball REJ* (2003) Defined cell groups in the rat suprachiasmatic nucleus have different day/night rhythms of single-unit activity in vivo. *J Biol Rhythms* 18: 26–42.
<https://doi.org/10.1177/0748730402239674>
47. *Salome N, Haage D, Perrissoud D, Moulin A, Demange L, Egecioglu E, Fehrentz JA, Martinez J, Dickson SL* (2009) Anorexigenic and electrophysiological actions of novel ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonists in rats. *Eur J Pharmacol* 612: 167–173.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.066>

The Effects of Ghrelin on Spike Activity of the Suprachiasmatic Nucleus Neurones of the Rat

A.N. Inyushkin*, A. Yu. Sharafutdinova, E.M. Inyushkina, and A.A. Inyushkin

Samara National Research University, Samara, Russia

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

In one of the most important non-photic mechanisms of the circadian biological clock synchronization with environmental geophysical 24 h rhythm, information on feeding schedule, composition and calorie content of food is used. Hormone ghrelin, a product of the neuroendocrine oxyntic cells of the gastric mucosa to be a signal molecule within this mechanism. In experiments on sagittal hypothalamic slices of male Wistar rats, the effects of 25 nM ghrelin on spike activity and parameters of spike information coding were investigated. Application of ghrelin induced an increase in spike frequency and a decrease in entropy of interspike interval distribution in 32.1% of the neurones recorded. In 29.6% of the cells, opposite responses in the form of a reduction of activity and an increase in the entropy of interspike interval distribution were observed. Parameters of spike activity of the reminder 38.3% neurones of the suprachiasmatic nucleus did not change. The observed responses of the entropy of interspike interval distribution indicate the appropriate changes in a degree of irregularity of interspike interval induced by ghrelin. Application of selective high-affinity antagonist of GHS-R1a receptor, JMV 2959 (100 nM) did not induce responses of the investigated parameters of spike activity but completely prevented changes of both, spike frequency and entropy of interspike interval distribution observed in the presence of ghrelin. The obtained data show that hormone ghrelin by a direct influence on the suprachiasmatic nucleus in vitro modulates the activity level and spike code of relatively numerous population of neurones of the nucleus, wherein the effects of ghrelin are implemented via GHS-R1a receptors. The results of the current study provide additional evidence in favour of the hypothesis on the involvement of ghrelin in mechanisms of non-photic entrainment of the circadian biological clock in accordance with severity of food motivation and level of metabolism.

Keywords: ghrelin, biological clock, circadian rhythms, suprachiasmatic nucleus, spike activity, spike code

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ УМЕРЕННОЙ ГИПОКСИЕЙ ПОВЫШАЕТ ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ТЯЖЕЛОЙ ГИПОКСИИ У КРЫС С ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНДОТОКСЕМИЕЙ

© 2024 г. Ж. А. Донина^{1,*}

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

*E-mail: zdonina@mail.ru

Поступила в редакцию 12.04.2024 г.

После доработки 16.05.2024 г.

Принята к публикации 17.05.2024 г.

Гиперпродукция медиаторов ЛПС-индуцированного воспалительного процесса (эндотоксикоз, сепсис) инициирует развитие острой дыхательной недостаточности (ОДН), нарушение газообмена, прогрессирующую гипоксемию и гиперкапнию, гипотонию, остановку дыхания и летальный исход. Тяжелый сепсис, ассоциированный с гипоксемией, остается основной причиной смертности, в связи с этим актуальной задачей является разработка методов повышения резистентности к острой гипоксии у септических пациентов. Целью работы явилось исследование эффективности preconditionирования кратковременной интервальной умеренной гипоксией для повышения толерантности к последующей тяжелой гипоксии у крыс с ЛПС-индуцированным эндотоксикозом. Эксперименты проведены на наркотизированных и трахеостомированных крысах-самцах Wistar. Эндотоксикоз моделировали введением раствора ЛПС (*Escherichia coli*) в количестве 7 мг/кг. Для оценки устойчивости к тяжелой гипоксии использовали метод возвратного дыхания с постепенным убыванием кислорода в ребризере от 21% до наступления апноэ. Гипоксическое preconditionирование (гипоксическая тренировка создавали также методом возвратного дыхания в режиме 3 циклов: снижение фракции кислорода в ребризере до 12% – 3 мин, 5 мин – нормоксия. Исследованы 3 группы животных: I – контроль – NaCl, II – ЛПС, III – ЛПС+ГТ. Регистрировали: показатели внешнего дыхания, среднее артериальное давление (АДср.), сатурацию (SpO₂), фракцию вдыхаемого O₂, время наступления апноэ, количество спонтанного восстановления дыхания (аутореанимация) в постгипоксическом периоде. Показано, что введение ЛПС в нормоксических условиях сопровождалось гипервентиляцией, гипоксемией и гипотонией. Максимальное ухудшение устойчивости к тяжелой гипоксии наблюдалось у крыс с ЛПС, что проявлялось падением АДср., SpO₂ и снижением возможности аутореанимации после гипоксического апноэ. Влияние гипоксической тренировки предотвращало снижение АДср., SpO₂ повысилась в 1.4 раза, выживаемость возросла в 2 раза, что сопоставимо с уровнем нормоксии до введения ЛПС. Предполагается, что эффективность гипоксического preconditionирования обусловлена ингибированием воспалительной реакции.

Ключевые слова: эндотоксикоз, гипоксия, гипотония, апноэ, гипоксическое preconditionирование

DOI: 10.31857/S0869813924060099, EDN: BEMYGP

ВВЕДЕНИЕ

Эндотоксемия – максимально выраженная активация иммунной системы, вызванная внедрением липополисахарида (ЛПС) грамотрицательных патогенов, часто используется в качестве трансляционной модели септических состояний [1, 2]. Внедрение ЛПС вызывает системное воспаление, приводящее к активации иммунных клеток, высвобождению медиаторов воспаления – провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6), простагландинов (PG), оксида азота (NO), транскрипционного ядерного фактора NF- κ B [3]. Гиперпродукция медиаторов иммунновоспалительного процесса способствует развитию полиорганной дисфункции, при которой чаще всего поражаются дыхательная и сердечно-сосудистая системы [4–6]. Характерными клиническими признаками острой дыхательной недостаточности (ОДН) является массивное диффузное поражение легких, пневмония, снижение эластических свойств легких, тромбоэмболия легочной артерии, ухудшение газообмена, прогрессирующая гипоксемия, риск остановки дыхания и летального исхода [7, 8]. Как свидетельствуют результаты клинических наблюдений у пациентов с ОДН, сопряженной с сепсисом, наблюдаются более тяжелые клинические исходы, чем отдельно при сепсисе или ОДН. Основными причинами высокой смертности при ОДН, ассоциированной с сепсисом, являются крайне острые гипоксические состояния, гиперкапния [9, 10] и сердечно-сосудистые нарушения в виде гипотонии [11]. Прогрессирование воспалительного процесса в сочетании с гипоксемией повышает риск необратимых нарушений кардиореспираторной системы, вызывает апноэ и ослабляет способность к ауторегимации (выживание) после острой аноксии [12–14].

Несмотря на достижения в области медицины, тяжелый сепсис и септический шок остаются основной причиной смертности в большинстве отделений интенсивной терапии, однако медикаментозных средств, специфичных для лечения сепсиса недостаточно. Параллельно данным об отсутствии эффективных средств для поддержания жизнеспособности у септических больных, имеются сообщения, что население горных районов с умеренной гипоксией менее подвержено инфекции COVID-19, имеющей сходную патофизиологию с эндотоксикозом (сепсисом) – развитие острого респираторного дистресс-синдрома, гипоксемия, гипотония. [15, 16]. Учитывая эти факты, предполагается, что предварительная адаптация к умеренной гипоксии может явиться эффективным способом повышения резистентности к последующей острой гипоксии. Согласно этой гипотезе, после соответствующего прерывистого гипоксического воздействия ткани и органы могут формировать сложный и активный механизм защиты от той же или сходной гипоксической среды и развивать резистентность к более тяжелому воздействию, тем самым предотвращая негативные последствия, которые она может вызвать [17, 18].

В настоящее время известно, что интервальная гипоксия является эффективным средством повышения устойчивости органов и тканей к острому дефициту кислорода, увеличения физической работоспособности и общей резистентности организма. В клинических исследованиях выявлены положительные эффекты preconditionирования интервальной гипоксией для улучшения состояния кардиореспираторной системы и толерантности органов и тканей к ишемии [19–24]. В то же время соответствующих исследований и клинических научно обоснованных данных относительно того, может ли кратковременное кондиционирование интервальной умеренной гипоксией повысить резистентность к острой гипоксии у септических пациентов недостаточно, а иммунологические эффекты кратковременной гипоксии малоизвестны.

В связи с изложенным целью работы явилось исследование эффективности интервальной умеренной гипоксии для повышения толерантности к последующей тяжелой гипоксии у крыс при экспериментальном моделировании эндотоксемии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные были получены из Биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и содержались в лабораторных условиях при свободном доступе к воде и пище. Опыты проведены на трахеостомированных, наркотизированных уретаном (1200 мг/кг, ООО Вектон, Россия) 24 крысах-самцах Вистар массой 280–300 г. Крысы случайным образом были разделены на 3 группы по 8 крыс в каждой: контрольным крысам (контроль) – вводили внутривенно 1 мл изотонического физиологического раствора, 2-й (ЛПС) и 3-й (ЛПС+ГТ) группе – раствор липополисахарида (*Escherichia coli*) производства Научно – исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи (Россия) в количестве 7 мг/кг (2 мг на крысу соответственно).

Спустя 40 мин после регистрации фоновых значений, для оценки устойчивости к тяжелой гипоксии крыс контрольной группы (контроль) и с ЛПС тестировали, используя метод возвратного дыхания (ВД) с постепенным снижением фракции кислорода (FiO_2) и удалением избытка CO_2 в ребризере до остановки дыхания (апноэ). Крыс группы (ЛПС+ГТ) предварительно до оценки устойчивости к тяжелой гипоксии подвергали гипоксической тренировке (ГТ) умеренной гипоксией, также используя методику ВД. В процессе ВД FiO_2 во вдыхаемой газовой смеси (в ребризере) постепенно снижалось до $12 \pm 0.5\%$ в течение 3 ± 1 мин, затем крысу переводили на дыхание комнатным воздухом. Режим тренировки состоял из 3 циклов: 3 мин – ГТ, 5 мин – нормоксия.

При оценке гипоксической устойчивости в процессе ВД непрерывно до наступления апноэ методом пневмотахографии регистрировали основные параметры дыхания: дыхательный объем (ДО), частоту дыхания (ЧД), минутный объем дыхания (МОД). Сатурацию ($\text{SpO}_2\%$) фиксировали ветеринарным пульсоксиметром типа UT (Zoomed, Россия). Систолическое и диастолическое давление (АДс, АДд) измеряли в общей сонной артерии прямой катетеризацией сосудов, используя преобразователь давления типа ПДП-300 (Россия). Среднее АД (АДср.) рассчитывали по формуле:

$$\text{АДср.} = \text{АДд} + (\text{АДс} - \text{АДд}) / 2.$$

В процессе тестирования в дыхательном контуре фиксировали F_1O_2 кислородным анализатором ПГК-06 («Инсовт», Санкт-Петербург), диоксида углерода (F_{ICO_2}) – многокомпонентным малоинерционным газоанализатором МАГ- 6П («Эксис», Москва, Россия), время наступления апноэ, количество спонтанного восстановления дыхания (аутореанимация) после гипоксического апноэ.

Обработку сигналов пневмотахограммы проводили с помощью аппаратно-программного комплекса сбора биологических данных Biograf-7 (ГУАП, Санкт-Петербург, Россия).

Для статистического анализа данных использовали программы Statistica 10.0 (Windows) и Microsoft Office Excel 2020. Полученные в экспериментах данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку распределение данных не соответствовало нормальному, оценку достоверности различий между группами проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Различия принимали за статистически значимые при $p < 0.05$ и $p < 0.01$. Данные на рисунках и в таблице представлены в виде медианы и интерквартильного размаха Me (Q1, Me, Q3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Однократное введение крысам ЛПС через 40 мин вызывало стимуляцию иммунных реакций и развитие системного воспаления. Это выражалось в значительном увеличении легочной вентиляции за счет роста ЧД и ДО, снижения сатурации и артериального давления (табл. 1). Наблюдаемые гипервентиляция, гипоксемия и гипотония являются основными клиническими проявлениями сепсиса, что свидетельствует об адекватности применяемой нами экспериментальной модели эндотоксемии.

Таблица 1. Влияние ЛПС на основные показатели кардиореспираторной системы в условиях нормоксии

Показатели	Физ. р-р (контроль) <i>Me</i> [x_{min} ; x_{max}]	ЛПС <i>Me</i> [x_{min} ; x_{max}]
Дыхательный объем, мл	1.0 [0.8; 1.1]	1.6 [1.5; 1.7]*
Частота дыхания, мин ⁻¹	81.5 [80.0; 89.3]	111.2 [118.2; 106.1]*
Минутный объем дыхания, мл/мин	78.5 [72.3; 84.0]	179.1 [172.4; 185.2]*
Насыщение артериальной крови кислородом, %	96 [95; 97]	84 [79; 89]*
Среднее артериальное давление, мм рт. ст.	120 [110; 130]	62 [57; 67]*

Результаты представлены в виде медианы и размаха *Me* [x_{min} ; x_{max}]. * – $p < 0.05$.

В процессе гипоксической тренировки у крыс группы ЛПС+ГТ в каждом из 3-минутных циклов при постепенном снижении O_2 до 12% наблюдалось увеличение МОД от 179.1 [172.4; 185.2] до 210.5 [200.4; 220.7] мл/мин преимущественно за счет роста ДО от 1.6 [1.5; 1.7] до 2.7 [2.4; 3.0] мл, повышение АДСр. от 62 [57; 67] до 95 [91; 99] мм рт. ст. и сатурации от 84 [79; 89] до 90 [85; 95]%. При переходе к нормоксическому дыханию показатели возвращались к значениям, измеренным после введения ЛПС.

При оценке устойчивости к тяжелой гипоксии постепенное снижение содержания O_2 вызывало апноэ у всех исследованных групп крыс. При этом продолжительность дыхания до наступления апноэ у контрольных животных, ЛПС и ЛПС+ГТ была примерно одинаковой, что составляло 8–9 мин. Степень гипоксии (F_1O_2) перед апноэ соответствовала: у контрольной группы 3–4%, ЛПС – 7–8%, ЛПС+ГТ – 5–6%.

В условиях прогрессивно нарастающей гипоксии у крыс контрольной, ЛПС и ЛПС+ГТ групп наблюдалось постепенное уменьшение АДСр. Как видно из рис. 1 в точке наступления апноэ максимально выраженное падение АДСр отмечалось у крыс группы ЛПС, влияние ГТ предотвращало снижение давления, что проявилось у крыс группы ЛПС+ГТ достижением уровня, сравнимого с исходными значениями в условиях нормоксии перед введением ЛПС.

Как представлено на рис. 2, насыщение артериальной крови кислородом в точке апноэ выявило существенные различия у всех исследованных крыс.

Так, у крыс группы ЛПС отмечалось снижение сатурации в 2 раза по сравнению с контрольными, тогда как влияние ГТ способствовало повышению SpO_2 до 85%, что превышало значения контрольных животных в 1.4 раза и было сопоставимо с уровнем нормоксии при введении ЛПС. При этом следует отметить, что апноэ у крыс группы ЛПС+ГТ возникало при большей степени гипоксии (F_1O_2 5–6%), чем в группе ЛПС (F_1O_2 7–8%).

Длительность постгипоксического апноэ в контроле, группах ЛПС и ЛПС+ГТ была сходной (24.0 ± 2.1 с), существенное различие проявлялось в количестве случаев спонтанного восстановления дыхания (аутореанимация). Как представлено на рис. 3, самопроизвольное возобновление дыхания в контрольной группе происходило у всех 8 животных (100%), в группе с дискретным введением ЛПС только 2 (12%) крысы сохраняли способность к восстановлению дыхания. Влияние предварительной ГТ, оказывая протективное действие, способствовало аутореанимации после тяжелой гипоксии у 4 животных, что в 2 раза превышает уровень у крыс с ЛПС-индуцированной эндотоксемией.

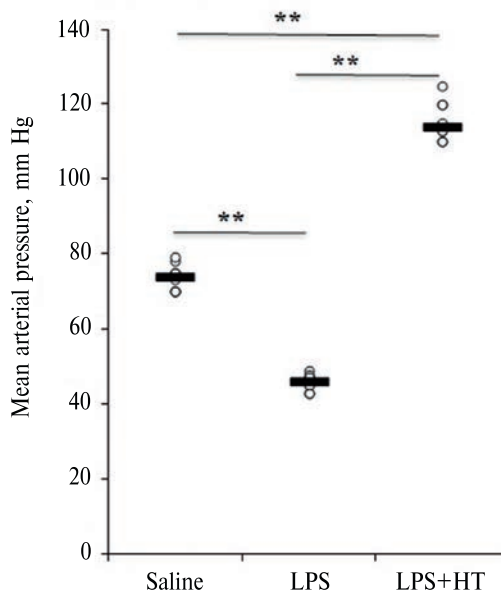


Рис. 1. Среднее артериальное давление у крыс с ЛПС-индуцированной эндотоксемией в точке гипоксического апноэ до и после гипоксической тренировки.

По оси абсцисс – экспериментальные группы, по оси ординат – среднее артериальное давление. ** $p < 0.01$

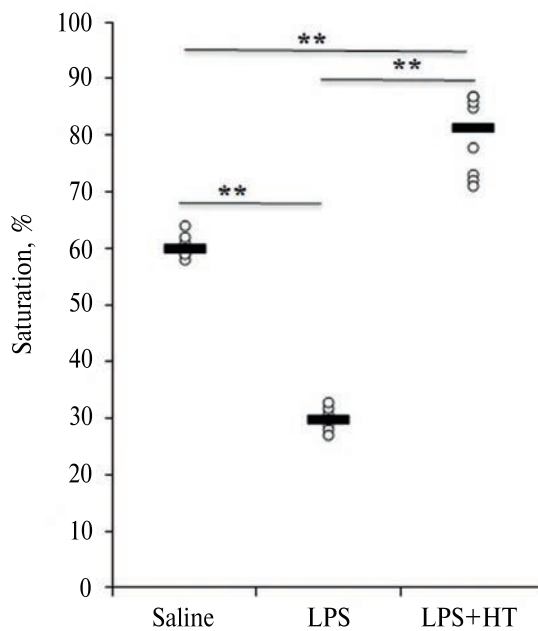


Рис. 2. Сатурация у крыс с ЛПС-индуцированной эндотоксемией в точке гипоксического апноэ до и после гипоксической тренировки. ** $p < 0.01$.

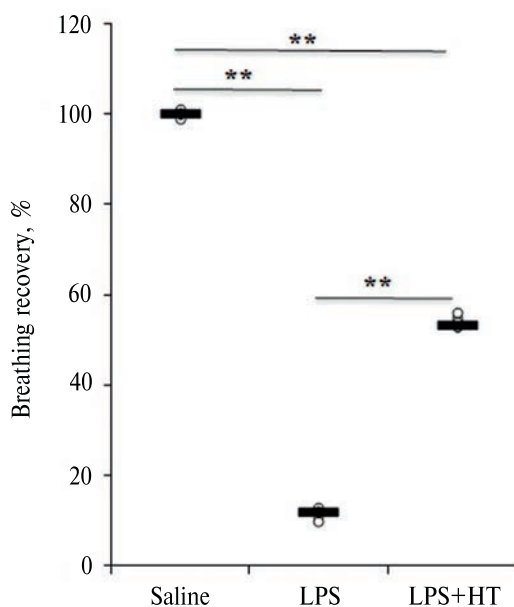


Рис. 3. Постгипоксическое восстановление дыхания у крыс с ЛПС-индуцированной эндотоксемией до и после гипоксической тренировки.

По оси абсцисс – экспериментальные группы, по оси ординат – восстановление в%.

** – $p < 0.01$.

Таким образом, прекондиционирование кратковременной нормобарической интервальной гипоксией способствует снижению степени гипотонии, повышению сатурации и увеличению количества спонтанного возобновления дыхания (аутореанимация) у крыс с ЛПС-индуцированной эндотоксемией после гипоксического апноэ, вызванного тяжелой гипоксией.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что в развитии патологического состояния важная роль принадлежит провоспалительным цитокинам (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6), при участии которых формируется иммунный ответ, развивается системная реакция острой фазы воспаления и запускается каскадная экспрессия цитокинов [3, 23, 24]. В проведенном исследовании не определялся цитокиновый профиль, активацию иммунной системы вызывали внедрением ЛПС, способствующем высвобождению медиаторов воспаления – провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6) простагландинов (PG), оксида азота (NO), транскрипционного ядерного фактора NF-kB [1–3]. Наблюдаемые изменения параметров внешнего дыхания, гипотония и гипоксемия после инфузии ЛПС в условиях нормоксии свидетельствуют об адекватности используемой нами модели сепсиса у крыс, наиболее полно соответствующей клинической ситуации [25, 26]. Ранее нами было установлено участие основных провоспалительных цитокинов в снижении резистентности к острой нарастающей гипоксии. При этом снижение устойчивости организма к острой гипоксии проявлялось ослаблением компенсаторного увеличения легочной вентиляции, резким снижением артериального давления, уменьшением насыщения

крови кислородом, более ранней остановкой дыхания (апноэ), при меньшей степени гипоксии, в затруднении спонтанного восстановления дыхания и повышении уровня летальности в постгипоксическом периоде [27, 28].

Обнаруженное нами в настоящей работе повышение резистентности к тяжелой гипоксии свидетельствует о протективном влиянии preconditionирования умеренной гипоксией. Рассматривая механизмы, лежащие в основе эффективности влияния умеренной ГТ на устойчивость к тяжелой гипоксии у крыс с ЛПС-индуцированной эндотоксемией, прежде всего следует отметить, что гипоксия может оказывать как положительный, так и отрицательный эффект, зависящий от концентрации, продолжительности и частоты гипоксического воздействия. В ряде работ установлено, что умеренная гипоксия (FiO_2 9–16%) и небольшое количество циклов (3–15 в день) обладает благоприятным эффектом, тогда как тяжелая гипоксия (FiO_2 2–8%) и более 40 циклов в день усугубляет патологическое состояние [29]. Эти данные свидетельствуют о том, что в основе эффектов кратковременной и хронической гипоксии лежат совершенно разные механизмы.

Можно предполагать, что умеренная гипоксия при кратковременном воздействии способствует стимуляции адаптивных физиологических перестроек. Однако вопрос о том, какие механизмы вовлечены в сложные уровни реализации адаптации к гипоксии окончательно не решен, поскольку данные об иммуномодулирующих эффектах гипоксии противоречивы.

Ряд авторов считает, что протективное действие кратковременной ГТ может являться следствием ингибирования воспалительных реакций путем подавления провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухолей, интерлейкин 1- β , интерлейкин-6) и активации противовоспалительных цитокинов (интерлейкин-10) [30, 31]. В других работах также было показано, что гипоксическое preconditionирование, предшествующее ЛПС-индуцированному септическому состоянию, может снижать апоптоз и экспрессию толл-подобных рецепторов (TLR4), осуществляющих трансмембранную передачу сигнала, активизирующих индукцию провоспалительных цитокинов и выработку противовоспалительного интерлейкина-10 [20].

Кроме того, известно, что гиперпродукция оксида азота (NO) в результате активации синтаз оксида азота (NOS) играет ключевую роль в развитии острой гипотонии, характерной для септических состояний различного происхождения [32]. В работах последних лет было продемонстрировано, что периодическая гипоксия препятствует массивной продукции NO в результате образования депо NO, что, в свою очередь, уменьшает вазодилатацию, эффективно способствует вазоконстрикции, тем самым предотвращая гипотонию и риски необратимых последствий [33]. Наши результаты хорошо согласуются с приведенными данными, поскольку у крыс с ЛПС-индуцированной эндотоксемией предварительная кратковременная ГТ устраняла гипотонию при последующем тестировании тяжелой гипоксией.

Согласно современным представлениям, гипоксия модулирует иммунные реакции посредством регуляторов адаптивных ответов клетки – транскрипционных факторов (индуцированные гипоксией факторы HIF-1 α и HIF-2 α) [17, 33]. Исследование цитокинового профиля (ИЛ-1, ИЛ-6, TNF- α и ИЛ-10) показало, что при тяжелой гипоксии содержание цитокинов в сыворотке крови многократно увеличилось, но при этом уровень HIF-1 α не изменился, что свидетельствовало об отсутствии корреляции между уровнем цитокинов и HIF-1 α [34]. Вероятней всего, что на ранней стадии адаптации к гипоксии провоспалительные цитокины не принимают участие в индукции HIF-1 α .

Помимо приведенных выше механизмов влияния кратковременной гипоксии, рассматривается образование пуринового нуклеотида аденозина в результате стимуляции гипоксией аденозинового рецептора A2B и ингибирования аденозинкиназы [35]. Аденозин вызывает усиленную экспрессию противовоспалительного цитокина – интерлейкина-10 (ИЛ-10), обладающего широким спектром тканезащитных и противовоспалительных свойств [36]. При воспалении также усиливается генерация аденозина,

следовательно, гипоксия и воспаление могут оказывать аддитивный или синергический эффект на образование аденозина [37, 38]. В условиях хронической гипоксии (11–27 дней) введение мышам эндотоксина вызывало повышение уровня провоспалительного цитокина ФНО- α , тогда как быстродействующий миметик гипоксии DMOG (диметил-локсалилглицин) у эндотоксических мышей оказывал противовоспалительный эффект [39]. Полученные в настоящей работе данные позволяют полагать, что иммуномодулирующие свойства кратковременной гипоксии, проявляющиеся через несколько минут после воздействия, вызваны быстрым возрастанием уровня внеклеточного аденозина, имеющего короткий период полураспада, и экспрессией ИЛ-10 [37, 38].

Вероятно, что помимо других механизмов протективного влияния умеренной гипоксии, предотвращение гипотонии, ингибирование воспалительных реакций путем подавления провоспалительных цитокинов, повышенное образование внеклеточного аденозина и экспрессия противовоспалительного ИЛ-10, играют значительную роль в ослаблении провоспалительного цитокинового ответа.

Таким образом, интервальная кратковременная нормобарическая гипоксия повышает резистентность к тяжелой гипоксии при ЛПС-индуцированной эндотоксемии. В целом полученные нами результаты демонстрируют возможность рассматривать прекондиционирование кратковременной умеренной гипоксией в качестве немедикаментозного метода ингибирования гиперактивации иммунной системы и повышения толерантности к тяжелой гипоксии при разработке новых стратегий лечения пациентов в критическом состоянии.

ВКЛАД АВТОРОВ

Постановка задачи, планирование эксперимента, проведение экспериментов, сбор данных и их обработка, написание и редактирование статьи – Ж. А. Д.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета в рамках государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН в рамках государственного задания (№ 1021062411787–0–3.1.8). 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 физиологии им. И.П. Павлова РАН, протокол №08/25 от 25 июня 2022 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черкасова МН (2021) К проблеме экспериментального моделирования сепсиса. Успехи совр биол 141(4): 368–381. [Cherkasova MN (2021) On the problem of experimental modeling of sepsis. The successes of modern biol 141(4): 368–381. (In Russ)].
2. Корнеев КВ (2019) Мышиные модели сепсиса и септического шока. Мол Биол 53(5): 799–814. [Korneev KV (2019) Mouse Models of Sepsis and Septic Shock. Mol Biol 53(5): 799–814. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0026898419050100>

3. Симбирцев АС, Тотолян АА (2015) Цитокины в лабораторной диагностике. Инфекц болезни: новости, мнение, обучение 2: 82–98. [Simbirtsev AS, Totolyan AA (2015) Cytokines in laboratory diagnostics. Infect diseases: news, opinion, education 2: 82–98. (In Russ)].
4. Jacono FJ, Mayer CA, Hsieh Y-H, Wilson G, Dick T (2011) Lung and brainstem cytokine levels are associated with breathing pattern changes in a rodent model of acute lung injury. *Resp Physiol Neurobiol* 178(3): 429–438.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.04.022>
5. Трушина ЕЮ, Костина ЕМ, Молотиллов БА, Типикин ВА, Баранова НИ (2019) Роль цитокинов IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 в иммунопатогенезе хронической обструктивной болезни легких. *Мед иммунол* 21(1): 89–98. [Trushina IM, Kostina EM, Molotilov BA, Tipikin VA, Baranova NI (2019) The role of cytokines IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 in the immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Med Immunol* 21(1): 89–98. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-1-89-98>
6. Hocker AD, Stokes AJ, Powell FL, Huxtable AG (2017) The impact of inflammation on respiratory plasticity. *Exp Neurol* 287: 243–253.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.07.022>
7. Spinelli E, Mauri T, Beutler JR, Pesenti A, Brodie D (2020) Respiratory drive in the acute respiratory distress syndrome: pathophysiology, monitoring, and therapeutic interventions. *Intensive Care Med* 46(4): 606–618.
<https://doi.org/10.1007/s00134-020-05942-6>
8. Yildirim F, Karaman I, Kaya A (2021) Current situation in ARDS in the light of recent studies: Classification, epidemiology and pharmacotherapeutics. *Tuberk Toraks* 69(4): 535–546.
<https://doi.org/10.5578/tt.20219611>
9. Szic I, Adam N, Pejak T (2022) Sepsis definition: wat's new in the treatment guidelines. *Acta Clin Croatica* 61(Suppl 1): 67–72.
<https://doi.org/10.20471/acc.2022.61.s1.11>
10. Saas P, Fan G-C (2023) Editorial: Hypoxia and inflammation: A two-way street. *Front Immunol* 8: 14:1171116.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1171116>
11. Angus DC, van der Poll T (2013) Severe sepsis and septic chock. *New Engl J Med* 69: 840–851.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623>
12. Vuichard D, Ganter M, Schimmer R, Suter D, Booy C, Reyes L, Pasch T, Beck-Schimmer B (2005) Hypoxia aggravates lypopolysaccaride-induced lung injury. *Clin Exp Immunol* 141: 248–260.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02835.x>
13. Lorea-Hernández J-J, Morales T, Rivera-Angulo A-J, Alcantara-Gonzalez D, Pena-Ortega F (2016) Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoresuscitation. *Glia* 64: 603–619.
<https://doi.org/10.1002/glia.22951>
14. Mirchandani AS, Jenkins SJ, Bain CC., Sanchez-Garcia MA, Lawson H, Coelho P, Murphy F, Griffith DM, Zhang A, Morrison T, Ly T, Arienti S, Sadiku P, Watts ER, Dickinson RS, Reyes L, Cooper G, Clark S, Lewis D, Kelly V, Spanos C, Musgrave KM, Delaney L, Harper I, Scott J, Parkinson NJ, Rostrom AJ, Baillie JK, Clohisey S, Pridans C, Campana L, Lewis PS, Simpson AJ, Dockrell DH, Schwarze J, Hirani N, Ratcliffe PJ, Pugh CW, Kranc K, Forbes SJ, Whyte MKB, Walmsley SR (2022) Hypoxia shapes the immune landscape in lung injury and promotes the persistence of inflammation. *Nature Immunol* 23(6): 927–939.
<https://doi.org/10.1038/s41590-022-01216-z>
15. Solaimanzadeh I (2020) Acetazolamide, nifedipine and phosphodiesterase inhibitors: rationale for their utilization as adjunctive countermeasures in the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Cureus* 12(3): e7343.
<https://doi.org/10.7759/cureus.7343>
16. Geier MR, Geier DA (2020) Respiratory conditions in coronavirus disease 2019 (COVID-19): Important considerations regarding novel treatment strategies to reduce mortality. *Med Hypotheses* 140: 109760.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy>
17. Semenza GL (2011) Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *New Engl J Med* 36(6): 537–547.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1011165>
18. Verges S, Chacaroun S, Godin-Ribuot D, Baillieul S (2015) Hypoxic conditioning as a new therapeutic modality. *Front Pediatr* 3: 58.
<https://doi.org/10.3389/fped.2015.00058>
19. Cai M, Chen X, Shan J, Xu P, Shi X, Chu L, Wang L (2021) Intermittent hypoxic preconditioning: A potential new powerful strategy for COVID-19. *Front Pharmacol* 12: 643619.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643619>

20. *Supriya R, Singh K, Gao Y, Tao D, Cheour S, Dutheil F, Baker J* (2023) Mimicking gene–environment interaction of higher altitude dwellers by intermittent hypoxia training: COVID-19 Preventive strategies. *Biology (Basel)* 12(1): 6.
<https://doi.org/10.3390/biology12010006>
21. *Zhang Q, Zhao W, Li S, Ding Y, Wang Y, Ji X* (2023) Intermittent hypoxia conditioning: A potential multi-organ protective therapeutic strategy. *Int J Med Sci* 20(12): 1551–1561.
<https://doi.org/10.7150/ijms.86622>
22. *Millet GP, Chapman RF, Girard O, Brocherie F* (2019) Is live high-train low altitude training relevant for elite athletes? Flawed analysis from inaccurate data. *Br J Sports Med* 53: 923–925.
<https://doi.org/10.1136/bjsports-2017-098083>
23. *Martin A, Millet G, Osredkar D, Mramor M, Faes C, Gouraud E, Debevec T, Pialoux V* (2020) Effect of pre-term birth on oxidative stress responses to normoxic and hypoxic exercise. *Redox Biol* (32): 101497.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101497>
24. *DeClue F, Williams K, Sharp C, Haak C, Lechner E, Reinero C* (2009) Systemic response to low-dose endotoxin infusion in cats. *Veter Immunol Immunopathol* 132: 167–174.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.06.002>
25. *Kumar S, Adhikari A* (2017) Dose-dependent immunomodulating effects of endotoxin in allergic airway inflammation. *Innate Immun* 23: 249–257.
<https://doi.org/10.1177/1753425917690443>
26. *Донина ЖА, Баранова ЕВ, Александрова НП* (2016) Влияние провоспалительного цитокина интерлейкина 1-β на резистентность организма к острой гипоксии. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 102(11): 1333–1342, [*Donina ZA, Baranova EV, Aleksandrova NP* (2016) Effects of proinflammatory cytokine interleukin 1β on resistance to acute hypoxia. *Russ J Physiol* 102 (11): 1333–1342. (In Russ)].
27. *Donina ZA, Baranova EV, Aleksandrova NP* (2021) A comparative assessment of effects of major mediators of acute phase response (IL-1, TNF-α, IL-6) on breathing pattern and survival rate in rats with acute progressive hypoxia. *J Evol Biochem Physiol* 57(4): 936–944.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021040177>
28. *Gangwar A, Paul S, Ahmad Y, Bhargava K* (2020) Intermittent hypoxia modulates redox homeostasis, lipid metabolism associated inflammatory processes and redox post-translational modifications: benefits at high altitude. *Scient Rep* 10(1): 7899.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-64848-x>
29. *Huang L, Wu S, Li H, Dang Z, Wu Y, Dang Y* (2019) Hypoxic preconditioning relieved ischemic cerebral injury by promoting immunomodulation and microglia polarization after middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 15: 1723:146388.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146388>
30. *Li G, Guan Y, Gu Y, Guo M, Ma W, Shao Q, Liu L, Ji X* (2023) Intermittent hypoxic conditioning restores neurological dysfunction of mice induced by long-term hypoxia. *CNS Neurosci Therap* 29: 202–217.
<https://doi.org/10.1111/cns.13996>
31. *Song M, Zwemer C, Whitesall S, D'Alecy L* (2007) Acute and conditioned hypoxic tolerance augmented by endothelial nitric oxide synthase inhibition in mice. *J Appl Physiol* 102(2): 610–615.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00894>
32. *McGettrick AF, O'Neill LAJ* (2020) The role of HIF in immunity and inflammation. *Cell Metabol* 32(4): 524–536.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.002>
33. *Kiers D, Wielockx B, Peters E, van Eijk LT, Gerretsen J, John A, Janssen E, Groeneveld R, Peters M, Damen L, Meneses AM, Krüger A, Langereis JD, Zomer AL, Blackburn MR, Joosten LA, Netea MG, Riksen NP, van der Hoeven JG, Scheffer GJ, Eltzschig HK, Pickkers P, Kox M* (2018) Short-term hypoxia dampens inflammation *in vivo* via enhanced adenosine release and adenosine 2B receptor stimulation. *eBioMedicine* 33: 144–156.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.06.021>
34. *Wang X, Wong K, Ouyang W et al.* (2019) Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 11(2): a028548.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028548>
35. *Santiago A, Madeira M, Boia R, Aires ID Rodrigues-Neves A, Santos P* (2020) Keep an eye on adenosine: Its role in retinal inflammation. *Pharmacol Therap* 210: 107513.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107513>
36. *Zhang T, Yu-Jing L, Ma T* (2022) The immunomodulatory function of adenosine in sepsis. *Front Immunol* 13: 936547.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.936547>

37. Baze MM, Hunter K, Hayes JP (2011) Chronic hypoxia stimulates an enhanced response to immune challenge without evidence of an energetic tradeoff. *J Exp Biol* 214: 3255–3268.
<https://doi.org/10.1242/jeb.054544>
38. Hams E, Sauners S, Cummins E, O'Connor A, Tambuwala M, Gallagher W, Byrne A, Campos-Torres A, Moynagh P, Jobin C, Taylor C, Fallon P (2011) The hydroxylase inhibitor dimethyloxallyl glycine attenuates endotoxic shock via alternative activation of macrophages and IL-10 production by B1 cells. *Shock* 36: 295–302.
<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318225ad7e>
39. Takahashi T, Otsuguro K, Ohta T, Ito S (2010) Adenosine and inosine release during hypoxia in the isolated spinal cord of neonatal rats. *Br J Pharmacol* 161: 1806–1816.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01002.x>

Preconditioning with Moderate Hypoxia Increases Tolerance to Subsequent Severe Hypoxia in Rats with LPS-Induced Endotoxemia

Zh.A. Donina^{a,*}

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

^{*}*e-mail: zdonina@mail.ru*

Hyperproduction of mediators of LPS-induced inflammatory process (endotoxiosis, sepsis) initiates the development of acute respiratory failure (ARF), impaired gas exchange, progressive hypoxemia and hypercapnia, hypotension, respiratory arrest and death. Severe sepsis associated with hypoxemia remains the main cause of death, and therefore the development of methods to increase resistance to acute hypoxia in septic patients is an urgent task. The aim of the work was to study the effectiveness of preconditioning with short-term intermittent moderate hypoxia to increase tolerance to subsequent severe hypoxia in rats with LPS-induced endotoxiosis. The experiments were carried out on anesthetized and tracheostomated male Wistar rats. Endotoxiosis was modeled by administration of a lipopolysaccharide solution (*Escherichia coli*) in an amount of 7 mg/kg. To assess resistance to severe hypoxia, the rebreathing method of (RM) with a gradual decrease in oxygen in the rebreather from 21% to the onset of apnea was used. Hypoxic preconditioning (hypoxic training, HT) was also created by the method of RM in the mode of 3 cycles: reduction of the oxygen fraction in the rebreather to 12% – 3 min, 5 min – normoxia. 3 groups of animals were studied: I-control-NaCl, II-LPS, III-LPS+HT. The following parameters were recorded: external respiration, mean blood pressure (APm), saturation (SpO₂), fraction of inhaled O₂, time of onset of apnea, the amount of spontaneous respiratory recovery (autoresuscitation) in the posthypoxic period. It was shown that the administration of LPS under normoxic conditions was accompanied by hyperventilation, hypoxemia and hypotension. The maximum deterioration in resistance to severe hypoxia was observed in rats with LPS, which was manifested by a decrease in APm, SpO₂ and a decrease in the possibility of autoresuscitation after hypoxic apnea. The effect of HT prevented a decrease in blood pressure, SpO₂ increased by 1.4 times, survival increased by 2 times, which is comparable to the level of normoxia before the introduction of LPS. It is assumed that the effectiveness of hypoxic preconditioning is due to the inhibition of the inflammatory response.

Keywords: endotoxiosis, hypoxia, hypotension, apnea, hypoxic preconditioning

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ И ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ ИМИ
МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТА НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ**

© 2024 г. Д. В. Григорьева^{1,*}, Е. В. Михальчик², Н. Г. Балабушевич^{2,3},
Д. В. Мосиевич³, М. А. Мурина², О. М. Панасенко², А. В. Соколов^{2,4} И. В. Горудко¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю. М. Лопухина
Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: dargr@tut.by

Поступила в редакцию 16.04.2024 г.

После доработки 20.05.2024 г.

Принята к публикации 21.05.2024 г.

Перспективными формами доставки лекарственных соединений являются микрочастицы ватерита, представляющие собой метастабильную форму карбоната кальция. Однако для более эффективной доставки целевых молекул (увеличения включения и удерживания) микрочастицы ватерита необходимо функционализировать биополимерами. Было исследовано влияние полисахаридов, муцина и микрочастиц ватерита, а также гибридных микрочастиц ватерита с вышеупомянутыми биополимерами на агрегационную активность тромбоцитов. Установлено, что фукоидан, гепарин и декстрансульфат (при внесении в обогащенную тромбоцитами плазму) и муцин (при добавлении к изолированным тромбоцитам) индуцировали агрегацию клеток. Пектин и хондроитинсульфат дозозависимым образом ингибировали АДФ- и тромбин-индуцированную агрегацию, муцин подавлял АДФ-индуцированную, а декстрансульфат – тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Микрочастицы ватерита в концентрации 100–1000 мкг/мл не влияли на агрегацию изолированных тромбоцитов, но вызывали 10–15%-ную агрегацию клеток в плазме; при этом в концентрации 1000 мкг/мл микрочастицы ватерита на ~ 30% препятствовали агонист-индуцированной агрегации клеток. Установлено, что гибридные микрочастицы ватерита с фукоиданом или гепарином при внесении как в обогащенную тромбоцитами плазму, так и к изолированным клеткам способны инициировать агрегацию тромбоцитов. Микрочастицы ватерита, функционализированные пектином или хондроитинсульфатом, не оказывали влияния на спонтанную агрегацию клеток и не влияли (с хондроитинсульфатом) или ингибировали (с пектином) агонист-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Таким образом, использование гибридных микрочастиц ватерита с пектином или фукоиданом/гепарином может быть перспективным для доставки препаратов, направленных на модуляцию (ингибирование – с пектином или активацию – с фукоиданом/гепарином) тромбоцитарного звена гемостаза.

Ключевые слова: тромбоцит, агрегация, микрочастица ватерита, полисахарид, муцин, аденозиндифосфат, тромбин

DOI: 10.31857/S0869813924060107, **EDN:** BEMOCM

ВВЕДЕНИЕ

Среди новых, быстро развивающихся систем доставки лекарственных соединений особое внимание уделяется тем системам, которые изготовлены из уже одобренных материалов для биомедицинского использования. К последним относятся кристаллы карбоната кальция, которые одобрены Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США, и используются в качестве дешевого армирующего материала для бумажных и пластиковых покрытий, при производстве продуктов питания, средств гигиены и косметики. Себестоимость производства систем доставки на основе частиц из карбоната кальция существенно ниже (в 250–500 раз), чем липосом, наночастиц металлов и других материалов [1]. Кроме того, они характеризуются уникальными механическими, физическими и химическими свойствами, низкой токсичностью, биосовместимостью и биоразлагаемостью [2, 3].

Ватерит представляет собой метастабильную фазу (кристаллическую полиморфную модификацию) карбоната кальция. Частицы ватерита особенно выделяют среди других полиморфов карбоната кальция с точки зрения их потенциального применения в биомедицине, включая доставку лекарств, ввиду их пористой морфологии и развитой внутренней структуры. Последнее свойство позволяет загружать в частицы ватерита молекулы разнообразной природы. Широкий спектр биологически активных веществ, в том числе низкомолекулярные соединения и макромолекулы, включают в частицы ватерита методом физической адсорбции в поры или соосаждения в процессе формирования самих частиц.

Одним из основных недостатков микрочастиц ватерита является довольно быстрая перекристаллизация в водных средах в более термодинамически устойчивый непористый кальцит [4, 5] или их полное растворение [6, 7]. На скорость этих процессов влияют физико-химические свойства среды, такие как pH [8], температура [5], ионная сила [9], а также наличие различных добавок [10–12]. С одной стороны, упомянутые выше свойства частиц ватерита дают возможность использовать их для контролируемого высвобождения лекарственных препаратов, например, для pH-зависимого высвобождения лекарств, доставляемых в места локализации опухоли [7, 13, 14]. А с другой стороны, при использовании частиц в качестве контейнеров для включения лекарств в системы доставки, при изготовлении платформ для тканевой инженерии, в продуктах питания/косметических средствах, предназначенных для длительного действия, требуется стабилизация ватерита и подавление его рекристаллизации. Одним из подходов для увеличения стабильности частиц ватерита является получение их гибридных форм, содержащих полимеры [5, 15, 16]. Например, муцин замедляет скорость перекристаллизации ватерита в кальцит [16].

Одним из надежных способов увеличения количества загружаемого водорастворимого лекарственного препарата в ватеритные системы доставки является включение биополимеров [17]. Например, наличие декстрансульфата в частицах ватерита приводило к увеличению загрузки пептидов в 5–10 раз, при адсорбции декстрансульфата нагрузка целевых веществ была приблизительно в 2 раза выше, чем при соосаждении [18]. Так, связывание лизоцима с гепарином было использовано для эффективной загрузки белка в гепарин-содержащие частицы ватерита [19]. Способность муцина к электростатическим, гидрофобным взаимодействиям и к образованию водородных связей с различными терапевтическими средствами используется для улучшения загрузки в системы доставки на основе ватерита. В работах [16, 20] муцин применяли для увеличения включения в ватерит доксорубина и апотинина, кроме того, высвобождение соединений из таких частиц было более пролонгированным по сравнению с частицами, не содержащими муцина. В работе [21] было показано, что при внутрибрюшинном введении крысам, инокулированным гепатомой Зейделя, доксирубин-содержащих частиц ватерита, легированных декстрансульфатом, наблюдается

продолжительное высвобождение антрациклинового антибиотика и достигается его эффективная концентрация, которая ингибирует рост опухоли. Улучшенный гипогликемический эффект у крыс был продемонстрирован после орального введения нагруженных инсулином наночастиц ватерита по сравнению с подкожной инъекцией препарата. Ватерит, покрытый слоем из фолиевой и гиалуроновой кислоты, обеспечивал эффективную защиту инсулина от потери биологической активности [22]. Сообщалось [23] также о введении ибупрофена в микрочастицы ватерита, модифицированные полистиролсульфонатом натрия. Было показано, что загрузка ибупрофена в поры частиц может достигать почти 10% от их массы, что является оптимальным для доставки. Ибупрофен, загруженный в поры микрочастиц ватерита с полистиролсульфонатом натрия, быстрее высвобождался в желудочный сок и медленнее в кишечную жидкость по сравнению с препаратом, высвобождаемым из частиц ватерита без полимерного покрытия.

Дополнением к вышеперечисленным важным свойствам ватерита, перспективным для использования в медицине является выделение при его растворении Ca^{2+} . Например, способность Ca^{2+} стимулировать активность остео- и одонтобластов используется при создании на основе ватерита каркасов для регенерации костной и зубной тканей [24–26]. Высвобождаемые из ватерита ионы Ca^{2+} эффективно сшивают анионные полисахариды (например, альгинат натрия, хитозан) с образованием гомогенных гидрогелей, используемых для создания систем доставки лекарств и ранозаживляющих средств [27–30].

В работах [31, 32] на основе карбоната кальция были разработаны микрочастицы с включением тромбина и протонированной транексамовой кислоты, которые при введении грызунам и кроликам в место обширного кровотечения при контакте с кровью быстро выделяют пузырьки CO_2 , что способствует их активному переносу в потоке крови и доставке тромбина в глубокие места повреждения сосудов. Такие системы доставки представляются перспективными для терапии геморрагических состояний.

При использовании ватеритных микрочастиц для доставки целевых лекарственных средств возможно их взаимодействие с клетками крови. Это особенно важно при разработке препаратов, направленных на коррекцию работы системы гемостаза, важная роль в которой отводится, прежде всего, тромбоцитам. Однако комплексные исследования влияния микрочастиц ватерита на функциональную активность тромбоцитов не проводились. Поскольку включение в ватеритные микрочастицы биополимеров позволяет не только стабилизировать, но и усилить их адгезию к клеткам [33], что особенно важно при разработке средств доставки лекарств, нацеленных на коррекцию геморрагических состояний, нами было исследовано влияние гибридных микрочастиц ватерита с биополимерами на агрегацию изолированных тромбоцитов, а также на агрегацию тромбоцитов в плазме крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие биополимеры: фукоидан из *Fucus vesiculosus* (20–200 кДа, содержание серы 7–11%, F-5631); пектин из яблок (30–100 кДа, степень этерификации 50–75%, 6.7% метоксигрупп, 74% галактуроновой кислоты, P-8471); хондроитинсульфат А из бычьей трахеи (20–30 кДа, C-8529) и муцин III типа из желудка свиньи (600 кДа, 0.5–1.5% сиаловых кислоты, M-1778) фирмы Sigma-Aldrich (США); декстрансульфат *Leuconostoc* ssp. (500 кДа, 2.3 сульфогруппы на звено, 31395) фирмы Fluka (Германия) и гепарин (10–20 кДа) фирмы Spofa (Чехия). В работе использовали также аденозиндифосфат (АДФ) фирмы Sigma-Aldrich (США).

Микрочастицы ватерита получали путем смешивания растворов CaCl_2 и Na_2CO_3 в 0.05 М трис-буфере (pH 7.0), как это было описано ранее [16]. Для синтеза гибридных

ных микрочастиц ватерита с биополимерами предварительно смешивали раствор CaCl_2 с полисахаридами или муцином [34, 35]. Синтезированные микрочастицы ватерита промывали бидистиллированной водой и высушивали лиофильно. Средний диаметр сферических микрочастиц ватерита определяли методом сканирующей электронной микроскопии (микроскоп Zeiss Merlin, Zeiss, Германия)) с помощью программы ImageJ, анализируя не менее 100 частиц. ζ -потенциал гибридных микрочастиц ватерита изучали методом динамического светорассеяния на установке Malvern Zetasizer Nano ZS (Великобритания). Диаметр и ζ -потенциал для нативных микрочастиц ватерита составили соответственно 3.6 ± 0.7 мкм и 2 ± 1 мВ; гибридных микрочастиц ватерита с декстрансульфатом – 3.8 ± 0.8 мкм и -13 ± 2 мВ; хондроитинсульфатом – 1.9 ± 0.5 мкм и -12 ± 2 мВ; гепарином – 2.0 ± 0.3 мкм и -9 ± 2 мВ; фукоиданом – 2.1 ± 0.5 мкм и -12 ± 2 мВ; пектином – 2.3 ± 0.7 мкм и -12 ± 2 мВ; муцином – 5.8 ± 0.7 мкм и -7 ± 1 мВ. Для получения тромбина использовали протромбин, отделенный от церулоплазмينا с помощью аффинной хроматографии на неомицин-агарозе и активированный при фильтрации через колонку с экарин-агарозой, с дополнительной очисткой α -тромбина при хроматографии на бензамидин-агарозе [36].

Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), а также изолированных тромбоцитов использовали донорскую кровь, стабилизированную цитратом натрия (109 мМ в соотношении 9: 1 по объему), полученную из Республиканского научного-практического центра трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Минск, Беларусь). Все процедуры по выделению тромбоцитов проводились при комнатной температуре с использованием исключительно пластиковой посуды. ОТП получали центрифугированием крови при 200 g в течение 10 мин, бестромбоцитарную плазму (БТП) – центрифугированием крови при 1600 g в течение 15 мин. Отмытые тромбоциты выделяли путем двукратного центрифугирования ОТП при 1600 g в течение 3 мин с последующим отмыванием осадка в трис/ЭДТА-буфере, содержащем (мМ) 13.3 трис, 120 NaCl, 15.4 KCl, 6 D-глюкозы и 1.5 ЭДТА (pH 6.9). Использование данного буфера предотвращало спонтанную агрегацию и слипание тромбоцитов, которые хранили при комнатной температуре в концентрации 2.5×10^9 кл/мл в течение не более 3 ч.

Агрегацию тромбоцитов исследовали с применением компьютеризированного анализатора агрегации AP2110 («СОЛАР», Минск, Беларусь) регистрируя изменение светопропускания клеточных суспензий на длине волны 540 нм при 37 °C и постоянном перемешивании. При исследовании агонист-индуцированной агрегации концентрацию тромбоцитов в ОТП доводили до 2.5×10^8 кл/мл разбавлением БТП, концентрацию отмытых тромбоцитов доводили до 2.5×10^8 кл/мл разбавлением фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим (мМ) 8.7 Na_2HPO_4 , 1.5 KH_2PO_4 , 137.0 NaCl, 2.7 KCl, 1.0 CaCl_2 и 0.5 MgCl_2 (pH 7.4), инкубировали в течение 2 мин при 37 °C и постоянном перемешивании, после чего добавляли тестируемые препараты в необходимой концентрации и/или агонист (2.5 мкМ АДФ к ОТП или 1 мкг/мл тромбина к изолированным тромбоцитам). Кривые агрегации записывали в течение 10 мин. Для количественной оценки агрегации использовали степень агрегации клеток, которая равнялась максимальному изменению величины светопропускания суспензии клеток [37].

Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего значения ($M \pm SE$). Минимальное количество независимых экспериментов, которое проводилось для каждой экспериментальной точки, составляло $n = 5$ при отсутствии других указаний. Достоверность различий средних рассчитывали с применением t -критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Кинетические кривые представлены как типичные для серии из 5–7 независимых экспериментов. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Origin 7.0 (OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние свободных биополимеров (фукоидана, пектина, муцина, гепарина, хондроитинсульфата и декстрансульфата), а также нативных и функционализированных биополимерами микрочастиц ватерита на спонтанную и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в ОТП.

Было обнаружено, что такие полисахариды как фукоидан, гепарин и декстрансульфат (рис. 1а, б) индуцировали агрегацию тромбоцитов в плазме; пектин, муцин и хондроитинсульфат не обладали такой способностью (данные не представлены). Наиболее сильным активатором агрегации тромбоцитов в ОТП оказался фукоидан, при внесении которого в диапазоне концентраций 100–1000 мкг/мл величина светопропускания клеточной суспензии составляла $50 \pm 10\%$. Также необходимо отметить, что фукоидан в значительно меньших концентрациях, чем остальные биополимеры, инициировал концентрационно-зависимую агрегацию тромбоцитов (рис. 1а, б). Гепарин и декстрансульфат обладали меньшей агрегационной активностью в отношении тромбоцитов: так, при внесении данных соединений в концентрации 1000 мкг/мл величина светопропускания составила $29 \pm 13\%$ и $32 \pm 12\%$ соответственно.

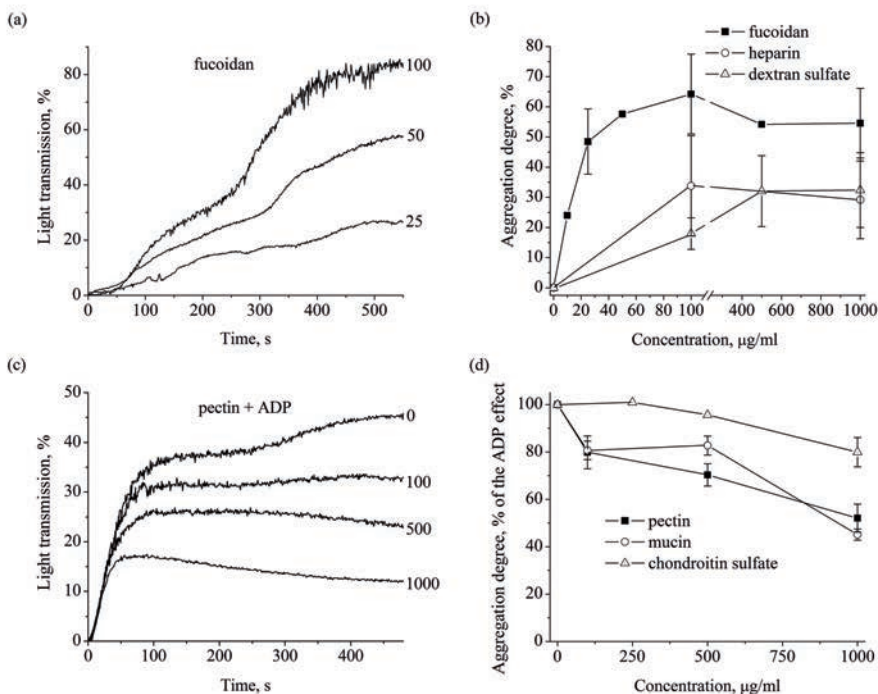


Рис. 1. Влияние тестируемых биополимеров на агрегацию тромбоцитов в ОТП. (а) и (с) – типичные кинетические кривые агрегации тромбоцитов в ОТП, инициированной внесением фукоидана (а) или АДФ в присутствии различных концентраций пектина (с). (б) и (д) – зависимости степени спонтанной (б) или индуцированной АДФ (д) агрегации тромбоцитов в ОТП от концентрации фукоидана, гепарина и декстрансульфата (б) или пектина, муцина и хондроитинсульфата (д). Используемая концентрация АДФ – 2.5 мкМ. Правее кинетических кривых числами указаны используемые концентрации биополимеров в мкг/мл.

Далее было исследовано влияние муцина, пектина и хондроитинсульфата, которые сами по себе не индуцировали агрегацию тромбоцитов в ОТП, на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Пектин и муцин концентрационно-зависимым образом (рис. 1с, d) ингибировали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов: максимальный эффект регистрировался при внесении препаратов в концентрации 1000 мкг/мл: подавление агрегации на ~ 48% при использовании пектина и на ~ 55% при использовании муцина. Хондроитинсulfат в диапазоне концентраций 100–500 мкг/мл не влиял, а в концентрации 1000 мкг/мл снижал на ~ 20% АДФ-индуцированную агрегацию клеток.

При исследовании влияния синтезированных микрочастиц ватерита на агрегацию тромбоцитов было выявлено, что внесение самих микрочастиц ватерита инициировало небольшую агрегацию тромбоцитов в ОТП, которая составляла порядка $12 \pm 2\%$ (рис. 2). Микрочастицы ватерита не оказывали влияния на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов вплоть до концентрации 500 мкг/мл (рис. 2) и лишь в концентрации 1000 мкг/мл ингибировали на ~ 30% АДФ-индуцированную агрегацию (данные не представлены).

Гибридные микрочастицы ватерита с фукоиданом, гепарином и декстрансульфатом при внесении в ОТП вызывали агрегацию тромбоцитов, что коррелировало со спо-

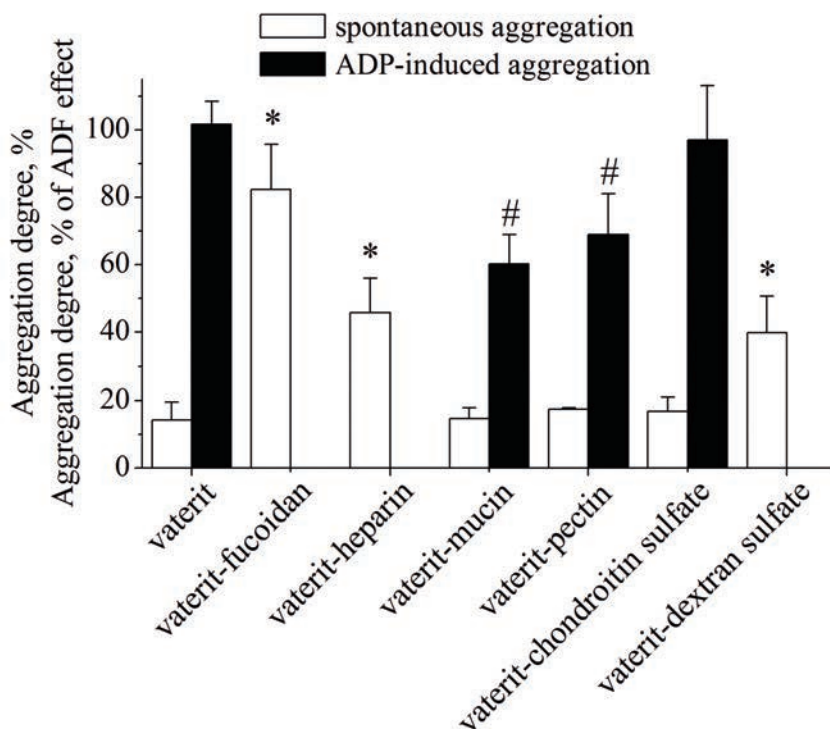


Рис. 2. Влияние нативных и функционализированных биополимерами микрочастиц ватерита (250 мкг/мл) на спонтанную и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в ОТП. Концентрация АДФ – 2.5 мкМ. * $p < 0.05$ по сравнению с эффектом нативных микрочастиц ватерита. В случае АДФ-индуцированной агрегации за 100% принята величина степени агрегации в контроле (при добавлении 2.5 мкМ АДФ). # $p < 0.05$ по сравнению с эффектом АДФ.

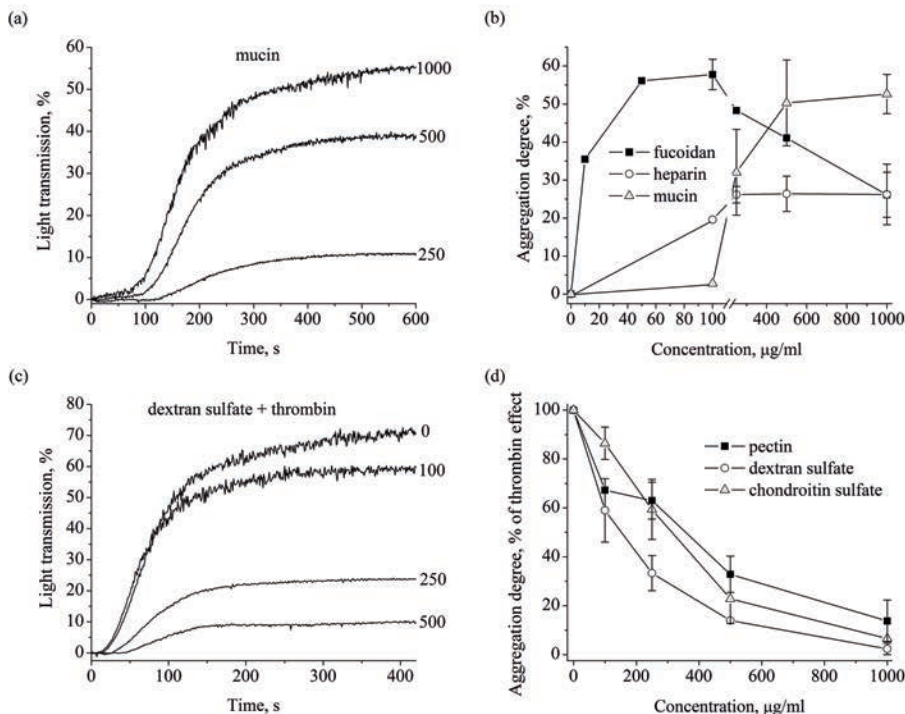


Рис. 3. Влияние тестируемых биополимеров на агрегацию изолированных тромбоцитов. (а) и (с) — типичные кинетические кривые агрегации изолированных тромбоцитов, инициированной внесением муцина (а) или тромбина в присутствии различных концентраций декстрансульфата (с). (b) и (d) — зависимости степени спонтанной (b) или индуцированной тромбином (d) агрегации изолированных тромбоцитов от концентрации фукоидана, гепарина и муцина (b) или пектина, декстрансульфата и хондроитинсульфата (d). Используемая концентрация тромбина — 1 мкг/мл. Правее кинетических кривых числами указана используемая концентрация биополимеров в мкг/мл.

способностью соответствующих биополимеров индуцировать спонтанную агрегацию. По всей видимости, агрегационный эффект этих гибридных микрочастиц ватерита мог быть обусловлен входящими в их состав биополимерами.

Что касается микрочастиц ватерита с муцином, пектином или хондроитинсульфатом, то их эффект на спонтанную агрегацию тромбоцитов в ОТП был сопоставим с действием нативного ватерита. Следует отметить, что добавление гибридных микрочастиц ватерита с муцином или пектином в ОТП приводило к снижению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Микрочастицы ватерита с хондроитинсульфатом не оказывали влияния на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (рис. 2).

Влияние свободных биополимеров (фукоидана, пектина, муцина, гепарина, хондроитинсульфата и декстрансульфата), а также нативных и функционализированных биополимерами микрочастиц ватерита на спонтанную и тромбин-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов

При исследовании спонтанной агрегации изолированных тромбоцитов было установлено, что внесение к отмытым тромбоцитам фукоидана, гепарина и муцина инициировало их агрегацию (рис. 3а, б). Наиболее сильными индукторами агрегации являлись муцин и фукоидан (рис. 3а, б). Хондроитинсульфат, декстран сульфат и пектин не

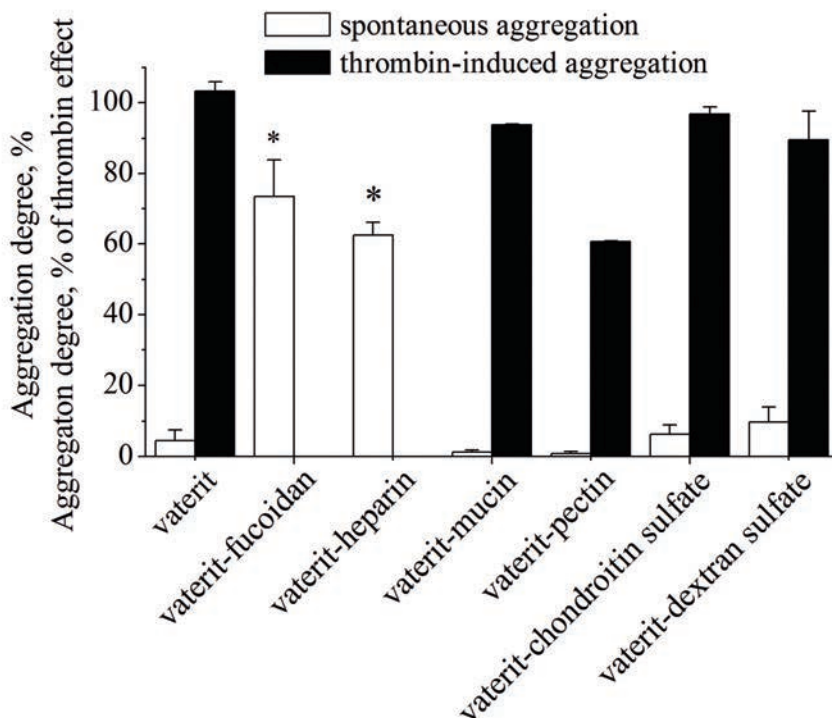


Рис. 4. Влияние нативных и функционализированных биополимерами микрочастиц ватерита (250 мкг/мл) на спонтанную и тромбин-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов. Концентрация тромбина – 1 мкг/мл. * $p < 0.05$ по сравнению с эффектом нативных микрочастиц ватерита. В случае тромбин-индуцированной агрегации за 100% принята величина степени агрегации в контроле (при добавлении 1 мкг/мл тромбина). # $p < 0.05$ по сравнению с эффектом тромбина.

индуцировали спонтанную агрегацию изолированных тромбоцитов, при этом концентрационно-зависимым образом ингибировали тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов (рис. 3с, d). Практически 100%-ное подавление тромбин-индуцированной агрегации клеток регистрировалось при использовании вышеупомянутых биополимеров в концентрации 1000 мкг/мл.

Внесение самих микрочастиц ватерита не влияло на спонтанную агрегацию изолированных тромбоцитов (рис. 4) во всем исследуемом концентрационном диапазоне (100–1000 мкг/мл). Микрочастицы ватерита не оказывали влияния на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов вплоть до концентрации 500 мкг/мл (рис. 4) и лишь в концентрации 1000 мкг/мл ингибировали на ~ 30% тромбин-индуцированную агрегацию клеток (данные не представлены) аналогично случаю АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в ОТП.

Инициаторами агрегации изолированных тромбоцитов среди тестируемых гибридных микрочастиц ватерита оказались микрочастицы ватерита с фукоиданом и гепарином, что коррелировало со способностью данных биополимеров вызывать агрегацию изолированных клеток. Следует отметить, что гибридные микрочастицы ватерита с муцином, в отличие от самого муцина, не вызывали агрегацию изолированных кле-

Таблица 1. Влияние свободных фукоидана, гепарина, пектина, муцина, декстрансульфата и хондроитинсульфата, а также данных биополимеров в составе микрочастиц ватерита на агрегацию тромбоцитов*

		фукоидан	гепарин	пектин	муцин	декстран- сульфат	хондроитин- сульфат
агрегация тромбоцитов в ОТП	спонтанная	+	+	—	—	+	—
	АДФ-индуцированная	н/о	н/о	↓	↓	н/о	= ↓
	спонтанная в присут- ствии функционали- зированных частиц ватерита	+	+	—	—	+	—
	АДФ-индуцированная в присутствии функ- ционализированных частиц ватерита	н/о	н/о	↓	↓	н/о	=

агрегация изолированных тромбоцитов	спонтанная	+	+	—	+	—	—
	тромбин-индуциро- ванная	н/о	н/о	↓	н/о	↓	↓
	спонтанная в присут- ствии функционали- зированных частиц ватерита	+	+	—	—	—	—
	тромбин-индуциро- ванная в присутствии функционализирован- ных частиц ватерита	н/о	н/о	↓	=	=	=

* «+» – вызывает агрегацию, «–» – не вызывает агрегацию, «↓» – ингибирует агонист-индуцированную агрегацию, «=» – не влияет на агонист-индуцированную агрегацию, «н/о» – измерение не проводилось.

ток. Ингибирующий эффект (~ 40%) на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов был выявлен для микрочастиц ватерита с пектином. Функционализированные декстрансульфатом, хондроитинсульфатом или муцином микрочастицы ватерита не оказывали влияния на агрегацию тромбоцитов в ответ на тромбин.

Эффекты свободных биополимеров, а также микрочастиц ватерита, функционализированных упомянутыми биополимерами, на спонтанную и индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов и тромбоцитов в ОТП суммированы в табл. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поиск новых средств доставки лекарственных соединений привел к рассмотрению карбоната кальция в форме ватерита в качестве перспективного объекта, обладающего идеальными механическими, физическими и химическими свойствами для включения

целевых молекул. Недавние исследования показали перспективность использования средств доставки на основе карбоната кальция для коррекции геморрагических состояний [29–32]. В данной работе были синтезированы гибридные микрочастицы ватерита с включением различных биополимеров и исследовано их влияние на агрегацию тромбоцитов – форменных элементов крови, которые играют важную роль как в обеспечении нормального гемостаза, так и в развитии патологических кровотечений и тромбозов. Тромбоциты вносят решающий вклад в сужение и восстановление просвета сосудов. Кроме того, тромбоциты взаимодействуют с другими клетками (лейкоцитами, эндотелиальными, гладкомышечными клетками) и играют важную роль в воспалении, сопутствующих патологиях и в развитии атеросклероза.

Нами было показано, что микрочастицы ватерита не влияют на агрегацию изолированных тромбоцитов, но вызывают небольшую агрегацию тромбоцитов в плазме (степень агрегации ~ 10–15%). Необходимо отметить, что микрочастицы ватерита как системы доставки не лишены недостатков, к которым относят, в том числе небольшое включение и быстрое высвобождение положительно заряженных молекул. Однако это препятствие можно преодолеть дополнительным введением в структуру микрочастиц ватерита природных биополимеров, например, полисахаридов, что приведет к возрастанию площади поверхности, пористости и увеличению включения и удерживания катионных молекул. Включение в состав микрочастиц ватерита биополимеров является одним из подходов для их стабилизации. Кроме того, использование биополимеров в составе ватерита позволяет увеличить способность включать целевые лекарственные вещества и при необходимости усилить адгезию микро/наночастиц ватерита к клеткам.

Биологически активные биополимеры природного происхождения нашли широкое применение в различных областях биотехнологий, в том числе для лечения и профилактики различных заболеваний и способны влиять на функциональные ответы иммунных клеток. Эти полимеры включают широкий круг подклассов, сходных с гепаринами, гликоаминогликанами, фукоиданом, сульфатами декстрана и др., способных регулировать также и систему гемостаза, оказывая как прокоагулянтные, так и антикоагулянтные эффекты. В качестве кандидатов для функционализации микрочастиц ватерита нами были выбраны фукоидан, гепарин, пектин, декстрансульфат, хондроитинсульфат и муцин, и вначале было исследовано действие этих соединений на агрегационную активность тромбоцитов.

Фукоиданы представляют собой класс богатых фукозой сульфатированных углеводов, обнаруженных в бурых морских водорослях и в иглокожих. Большинство фукоиданов различного происхождения состоят из сульфатированной L-фукозы, на долю которой приходится около 34–44%, небольшого количества галактозы, маннозы, ксилозы и уроновых кислот, а также ацетильных групп [39]. Хотя класс молекул, называемых «фукоиданы», сходны по своей биологической активности, в ряде случаев наблюдаются большие различия в проявляемых ими эффектах в зависимости от источника выделения, а также молекулярной массы, описанные в обзорах [39–41]. Полученные нами данные о сильной агрегантной активности используемого фукоидана согласуются с результатами работы [42], авторы которой показали, что фукоидан из *Fucus vesiculosus* индуцирует активацию тромбоцитов посредством тирозинкиназа-зависимого пути (SYK и SFK), который опосредуется через рецептор CLEC-2 и приводит к активации интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Гепарин относится к семейству гликоаминогликанов, белковое ядро которого включает в основном остатки глицина и серина, 2/3 последнего связывается с полисахаридными цепями, в основе которых лежит цепочка из повторяющихся сульфатированного N-ацетил-D-глюкозамина, L-идуроновой кислоты и D-глюкуроновой кислоты [43]. Несмотря на то, что гепарин является наиболее широко используемым антикоагулянтом во всем мире, в литературе имеются данные о том, что он прямо [44, 45] или косвенно [46, 47] способствует агрегации тромбоцитов. Полученные нами данные об

агрегации изолированных тромбоцитов и тромбоцитов в ОТП в присутствии гепарина согласуются с данными авторов работ [43, 44], в которых показано, что нефракционированный гепарин вызывает агрегацию тромбоцитов и фосфорилирование рецептора тромбоцитарно-эндотелиальной агрегации 1-го типа (PEAR-1) в отмытых тромбоцитах и заметную активацию интегрина $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ в цельной крови; PEAR-1 в свою очередь стимулирует агрегацию тромбоцитов через сигнальный каскад SRC-PI3K β -АКТ. Примечательно, что, как и в работе [44], согласно нашим данным, гепарин вызывает гораздо более медленный агрегационный ответ, чем фукоидан из *Fucus vesiculosus*. По всей видимости, данный факт ассоциирован с большим размером и разветвленностью фукоидана. Также необходимо отметить, что при добавлении гепарина регистрируется умеренная, но необратимая агрегация тромбоцитов, из чего можно сделать вывод о том, что, по всей вероятности, ответ тромбоцитов на гепарин не сопровождается высвобождением содержимого плотных и α -гранул.

Пектины являются несulfатированными полисахаридами, образованными, главным образом, остатками D-галактурановой кислоты, присутствующими во всех высших растениях, особенно фруктах. Взаимодействие пектина с клетками сильно зависит от конкретных структурных характеристик используемой макромолекулы (степени метилэтерификации, ацетилирования и нейтральных боковых цепей рамногалактуронана I или рамногалактуронана II). В наших экспериментах пектин сам по себе не влиял на спонтанную, но концентрационно-зависимым образом ингибировал как АДФ-, так и тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов, что согласуется с результатами работы [48], авторы которой выявили антикоагулянтную и антитромботическую активность двух полисахаридов с различной молекулярной массой, полученных из лимонного пектина, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Хондроитинсульфат является типичным гликозаминогликаном, который представляет собой линейный полисахарид, структура которого основана на sulfатированных (1–3)- β -N-ацетил-D-галактозамине и (1–4)- β -глюкуроновой кислоте [49]. В ряде работ сообщается об антикоагулянтном действии хондроитинсульфата [50, 51]. Что касается регуляции функций тромбоцитов, то в работе [52] было описано, что хондроитин-4-сульфат ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, это согласуется с полученными нами данными, указывающими на способность хондроитинсульфата концентрационно-зависимым образом препятствовать агонист-индуцированной агрегации тромбоцитов. Данный эффект может быть обусловлен способностью хондроитинсульфата связывать ионы Ca^{2+} [53].

Муцины представляют собой сильно гликозилированные амфифильные гликопротеины с молекулярной массой до 20 МДа. В наших исследованиях было выявлено, что муцин инициирует агрегацию изолированных тромбоцитов, это согласуется с данными работ [54, 55], авторами которых было показано, что белок муцинового ряда подопланин напрямую взаимодействует с CLEC-2, тем самым способствуя агрегации и активации тромбоцитов. Неспособность муцина вызывать агрегацию тромбоцитов в ОТП может быть обусловлена конкуренцией муцина с другими гликопротеинами плазмы крови за лектино-подобный рецептор CLEC-2 на мембране тромбоцитов. Кроме того, в наших экспериментах в ОТП муцин концентрационно-зависимым образом ингибировал АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

В настоящей работе показано, что высокомолекулярный декстрансульфат (молекулярная масса 500 кДа) инициирует агрегацию тромбоцитов в плазме, это согласуется с результатами авторов работы [56], в которой было показано, что такой декстрансульфат индуцирует активацию рецептора фибриногена ($\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$) посредством передачи сигналов CLEC-2/SYK и посредством SYK-независимого SFK/PI3K/АКТ-зависимого тирозинкиназного пути с изначальным связыванием с рецептором PEAR-1 на тромбоцитах человека. Отсутствие аналогичного эффекта на изолированных тромбоцитах

может быть обусловлено превалированием Ca^{2+} -связывающей способности декстран-сульфата [57] над рецептор-опосредованной активацией тромбоцитов.

Таким образом, можно заключить, что поливалентная природа биополимеров в сочетании с их сложной гетерогенной структурой, обуславливающей множественные белковые взаимодействия и сложные механизмы активации тромбоцитов, приводит к необходимости изучения каждого конкретно используемого в эксперименте полисахарида и белка на активацию/ингибирование функциональных ответов тромбоцитов.

При исследовании влияния гибридных микрочастиц ватерита на агрегацию тромбоцитов было выявлено, что функционализированные фукоиданом или гепарином частицы вызвали сильную агрегацию клеток, что, по всей видимости, обусловлено выявленными нами агрегантными эффектами самих полисахаридов. Интересно отметить, что гибридные микрочастицы ватерита с муцином не вызвали агрегацию изолированных тромбоцитов несмотря на то, что сам гликопротеин является стимулятором агрегации изолированных клеток. Данный факт, вероятно, обусловлен включением участков молекул, связывающихся с рецепторами на мембране тромбоцитов, вглубь гибридных микрочастиц ватерита. Однако при этом такие гибридные микрочастицы сохраняли способность самого муцина ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в плазме. Также интересно отметить, что хондроитинсульфат в составе микрочастиц ватерита терял способность препятствовать агонист-индуцированной агрегации тромбоцитов. Гибридные микрочастицы ватерита с пектином, подобно самому пектину, эффективно ингибировали как тромбин- так и АДФ-индуцированную агрегацию клеток.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что для разработки средств доставки на основе ватерита с целью коррекции геморрагических состояний перспективным является использование гибридных микрочастиц ватерита с гепарином или фукоиданом (для агрегантных эффектов). В то же время для антиагрегантных эффектов наиболее подходящим полисахаридом для включения в микрочастицы ватерита является пектин. Микрочастицы ватерита, функционализированные хондроитинсульфатом, являются нейтральными в отношении тромбоцитов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И. В. Г. и О. М. П.), сбор данных (Д. В. Г., Н. Г. Б., Д. В. М., А. В. С.), обработка данных (Д. В. Г.), написание и редактирование манускрипта (Д. В. Г., Е. В. М., М. А. М., О. М. П., А. В. С., И. В. Г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств совместного гранта Российского научного фонда (проект № 23–45–10026) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б23РНФ-093). Получение микрочастиц ватерита проведено при частичной поддержке темы 121041500039–8 МГУ им. М.В. Ломоносова. 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 Комиссией по этике Республиканского научно-практического центра трансфузиологии и медицинских биотехнологий Министерства здравоохранения Республики Беларусь, протокол № 1 от 10.04.2022 г.

Каждый участник 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. *Trushina DB, Borodina TN, Belyakov S, Antipina MN* (2022) Calcium carbonate vaterite particles for drug delivery: Advances and challenges. *Mater Today Adv* 14: 100214.
<https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.100214>
2. *Cavallaro G, Lazzara G, Fakhruddin R* (2018) Mesoporous inorganic nanoscale particles for drug adsorption and controlled release. *Ther Deliv* 9: 287–301.
<https://doi.org/10.4155/tde-2017-0120>
3. *Vikulina A, Voronin DV, Fakhruddin RF, Vinokurov VA, Volodkin D* (2020) Naturally derived nano- and micro- drug delivery vehicles: halloysite, vaterite and nanocellulose. *New J Chem* 44: 5638–5655.
<https://doi.org/10.1039/C9NJ06470B>
4. *Konopacka-Łyskawa D, Czaplicka N, Łapiński M, Kościelska B, Bray R* (2020) Precipitation and transformation of vaterite calcium carbonate in the presence of some organic solvents. *Materials (Basel)* 13: 2742.
<https://doi.org/10.3390/ma13122742>
5. *Kralj D, Brečević L, Kontrec J* (1997) Vaterite growth and dissolution in aqueous solution III. Kinetics of transformation. *J Cryst Growth* 177: 248–257.
[https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(96\)01128-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(96)01128-1)
6. *Svenskaya YI, Genina EA, Parakhonskiy BV, Lengert EV, Talnikova EE, Terentyuk GS, Utz SR, Gorin DA, Tuchin VV, Sukhorukov GB* (2019) A simple non-invasive approach toward efficient transdermal drug delivery based on biodegradable particulate system. *ACS Appl Mater Interfaces* 11: 17270–17282.
<https://doi.org/10.1021/acsami.9b04305>
7. *Svenskaya Y, Parakhonskiy B, Haase A, Atkin V, Lukyanets E, Gorin D, Antolini R* (2013) Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer. *Biophys Chem* 182: 11–15.
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.07.006>
8. *Sheng Han Y, Hadiko G, Fuji M, Takahashi M* (2006) Crystallization and transformation of vaterite at controlled pH. *J Cryst Growth* 289: 269–274.
<https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2005.11.011>
9. *Parakhonskiy B, Tessarolo F, Haase A, Antolini R* (2012) Dependence of sub-micron vaterite container release properties on pH and ionic strength of the surrounding solution. *Adv Sci Technol* 86: 81–85.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AST.86.81>
10. *Wang X, Kong R, Pan X, Xu H, Xia D, Shan H, Lu JR* (2009) Role of ovalbumin in the stabilization of metastable vaterite in calcium carbonate biomineralization. *J Phys Chem B* 113: 8975–8982.
<https://doi.org/10.1021/jp810281f>
11. *Katsifaras A, Spanos N* (1999) Effect of inorganic phosphate ions on the spontaneous precipitation of vaterite and on the transformation of vaterite to calcite. *J Cryst Growth* 204: 183–190.
[https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(99\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(99)00174-8)
12. *Al Omari MM, Rashid IS, Qinna NA, Jaber AM, Badwan AA* (2016) Calcium carbonate. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol 41: 31–132.
<https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.11.003>
13. *Choukrani G, Freile JA, Avtenyuk NU, Wan W, Zimmermann K, Bremer E, Dähne L* (2021) High loading efficiency and controlled release of bioactive immunotherapeutic proteins using vaterite nanoparticles. *Part Part Syst Charact* 38: 2100012.
<https://doi.org/10.1002/ppsc.202100012>
14. *Dong Z, Feng L, Zhu W, Sun X, Gao M, Zhao H, Chao Y, Liu Z* (2016) CaCO₃ nanoparticles as an ultra-sensitive tumor-pH-responsive nanopatform enabling real-time drug release monitoring and cancer combination therapy. *Biomaterials* 110: 60–70.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.025>
15. *Mayorga IC, Astilleros JM, Fernández-Díaz L* (2019) Precipitation of CaCO₃ polymorphs from aqueous solutions: the role of pH and sulphate groups. *Minerals* 9: 1–16.
<https://doi.org/10.3390/min9030178>

16. Balabushevich NG, Kovalenko EA, Le-Deygen IM, Filatova LY, Volodkin D, Vikulina AS (2019) Hybrid CaCO_3 -mucin crystals: effective approach for loading and controlled release of cationic drugs. *Mater Des* 182: 108020.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108020>
17. Balabushevich NG, Lopez de Guereñu AV, Feoktistova NA, Volodkin D (2015) Protein loading into porous CaCO_3 microspheres: adsorption equilibrium and bioactivity retention. *Phys Chem Chem Phys* 17: 2523–2530.
<https://doi.org/10.1039/C4CP04567>
18. Sudareva N, Suvorova O, Saprykina N, Smirnova N, Bel'tyukov P, Petunov S, Radilov A, Vilesov A (2018) Two-level delivery systems based on CaCO_3 cores for oral administration of therapeutic peptides. *J Microencapsul* 35: 619–634.
<https://doi.org/10.1080/02652048.2018.1559247>
19. Shi P, Luo S, Voit B, Appelhans D, Zan X (2018) A facile and efficient strategy to encapsulate the model basic protein lysozyme into porous CaCO_3 . *J Mater Chem B* 6: 4205–4215.
<https://doi.org/10.1039/c8tb00312b>
20. Balabushevich NG, Sholina EA, Mikhalechik EV, Filatova LY, Vikulina AS, Volodkin D (2018) Self-assembled mucin-containing microcarriers via hard templating on CaCO_3 crystals. *Micromachines* 9: 1–16.
<https://doi.org/10.3390/mi9060307>
21. Sudareva NN, Suvorova OM, Suslov DN, Galibin OV, Vilesov AD (2021) Dextran sulfate coated CaCO_3 vaterites as the systems for regional administration of doxorubicin to rats. *Cell Ther Transplant* 10: 71–77.
<https://doi.org/10.18620/ctt-1866-8836-2021-10-3-4-71-77>
22. Trushina DB, Bukreeva TV, Kovalchuk MV, Antipina MN (2014) CaCO_3 vaterite microparticles for biomedical and personal care applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 45: 644–658.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.050>
23. Wang C, He C, Tong Z, Liu X, Ren B, Zeng F (2006) Combination of adsorption by porous CaCO_3 microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery. *Int J Pharm* 308: 160–167.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.004>
24. Saveleva MS, Ivanov AN, Chibrikova JA, Abalymov AA, Surmeneva MA, Surmenev RA, Parakhonskiy BV, Lomova MV, Skirtach AG, Norkin IA (2021) Osteogenic capability of vaterite-coated nonwoven polycaprolactone scaffolds for in vivo bone tissue regeneration. *Macromol Biosci* 21: 2100266.
<https://doi.org/10.1002/mabi.202100266>
25. Dizaj SM, Barzegar-Jalali M, Hossein Zarrintan M, Adibkia K, Lotfipour F (2015) Calcium carbonate nanoparticles; potential in bone and tooth disorders. *Pharm Sci* 20: 175–182.
<https://doi.org/10.5681/PS.2015.008>
26. An S (2019) The emerging role of extracellular Ca^{2+} in osteo/odontogenic differentiation and the involvement of intracellular Ca^{2+} signaling: from osteoblastic cells to dental pulp cells and odontoblasts. *J Cell Physiol* 234: 2169–2193.
<https://doi.org/10.1002/jcp.27068>
27. Abalymov A, Lengert E, Van der Meeren L, Saveleva M, Ivanova A, Douglas TEL, Skirtach AG, Volodkin D, Parakhonskiy B (2022) The influence of Ca/Mg ratio on autogelation of hydrogel biomaterials with bioceramic compounds. *Biomater Adv* 133: 112632.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112632>
28. Sergeeva A, Vikulina AS, Volodkin D (2019) Porous alginate scaffolds assembled using vaterite CaCO_3 crystals. *Micromachines (Basel)* 10: 357.
<https://doi.org/10.3390/mi10060357>
29. Niu YQ, Liu JH, Aymonier C, Fermani S, Kralj D, Falini G, Zhou CH (2022) Calcium carbonate: controlled synthesis, surface functionalization, and nanostructured materials. *Chem Soc Rev* 51: 7883–7943.
<https://doi.org/10.1039/d1cs00519g>
30. Yu Q, Su B, Zhao W, Zhao C (2023) Janus self-propelled chitosan-based hydrogel spheres for rapid bleeding control. *Adv Sci (Weinh)* 10: 2205989.
<https://doi.org/10.1002/advs.202205989>
31. Li Q, Hu E, Yu K, Xie R, Lu F, Lu B, Bao R, Zhao T, Dai F, Lan G (2020) Self-propelling janus particles for hemostasis in perforating and irregular wounds with massive hemorrhage. *Adv Funct Mater* 30: 2004153.
<https://doi.org/10.1002/adfm.202004153>
32. Baylis JR, Yeon JH, Thomson MH, Kazerooni A, Wang X, St John AE, Lim EB, Chien D, Lee A, Zhang JQ, Piret JM, Machan LS, Burke TF, White NJ, Kastrop CJ (2015) Self-propelled particles that transport cargo through flowing blood and halt hemorrhage. *Sci Adv* 1: 1500379.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1500379>

33. Campbell J, Ferreira AM, Bowker L, Hunt J, Volodkin D, Vikulina A (2022) Dextran and its derivatives: biopolymer additives for the modulation of vaterite CaCO_3 crystal morphology and adhesion to cells. *Advan Mater Interfac* 9: 2201196.
<https://doi.org/10.1002/admi.202201196>
34. Mikhailchik EV, Basyreva LY, Gusev SA, Panasenکو OM, Klinov DV, Barinov NA, Morozova OV, Moscalets AP, Maltseva LN, Filatova LY, Pronkin EA, Bespyatykh JA, Balabushevich NG (2022) Activation of neutrophils by mucin-vaterite microparticles. *Int J Mol Sci* 23: 10579.
<https://doi.org/10.3390/ijms231810579>
35. Mikhailchik EV, Maltseva LN, Firova RK, Murina MA, Gorudko IV, Grigorieva DV, Ivanov VA, Obratsova EA, Klinov DV, Shmeleva EV, Gusev SA, Panasenکو OM, Sokolov AV, Gorbunov NP, Filatova LY, Balabushevich NG (2023) Incorporation of pectin into vaterite microparticles prevented effects of adsorbed mucin on neutrophil activation. *Int J Mol Sci* 24: 15927.
<https://doi.org/10.3390/ijms242115927>
36. Kotova YN, Podoplelova NA, Obyedennyi SI, Kostanova EA, Ryabykh AA, Demyanova AS, Biriukova MI, Rosenfeld MA, Sokolov AV, Chambost H, Kumsکova MA, Ataulakhanov FI, Alessi MC, Panteleev MA (2019) Binding of coagulation factor XIII zymogen to activated platelet subpopulations: roles of integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ and fibrinogen. *Thromb Haemost* 119: 906–915.
<https://doi.org/10.1055/s-0039-1683912>
37. Gorudko IV, Sokolov AV, Shamova EV, Grudinina NA, Drozd ES, Shishlo LM, Grigorieva DV, Bushuk SB, Bushuk BA, Chizhik SA, Cherenkevich SN, Vasilyev VB, Panasenکو OM (2013) Myeloperoxidase modulates human platelet aggregation via actin cytoskeleton reorganization and store-operated calcium entry. *Biol Open* 2: 916–923.
<https://doi.org/10.1242/bio.20135314>
38. Lin Z, Tan X, Zhang Y, Li F, Luo P, Liu H (2020) Molecular targets and related biologic activities of fucoidan: a review. *Mar Drugs* 18: 376.
<https://doi.org/10.3390/md18080376>
39. Fitton JH (2011) Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Mar Drugs* 9: 1731–1760.
<https://doi.org/10.3390/md9101731>
40. Fitton JH, Stringer DN, Karpiniec SS (2015) Therapies from fucoidan: an update. *Mar Drugs* 13: 5920–5946.
<https://doi.org/10.3390/md13095920>
41. Dubashynskaya NV, Gasilova ER, Skorik YA (2023) Nano-sized fucoidan interpolyelectrolyte complexes: recent advances in design and prospects for biomedical applications. *Int J Mol Sci* 24: 2615.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032615>
42. Manne BK, Getz TM, Hughes CE, Alshehri O, Dangelmaier C, Naik UP, Watson SP, Kunapuli SP (2013) Fucoidan is a novel platelet agonist for the C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2). *J Biol Chem* 288: 7717–7726.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.424473>
43. Qiu M, Huang S, Luo C, Wu Z, Liang B, Huang H, Ci Z, Zhang D, Han L, Lin J (2021) Pharmacological and clinical application of heparin progress: an essential drug for modern medicine. *Biomed Pharmacother* 139: 111561.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111561>
44. Kardeby C, Evans A, Campos J, Al-Wahaibi AM, Smith CW, Slater A, Martin EM, Severin S, Brill A, Pejler G, Sun Y, Watson SP (2023) Heparin and heparin proteoglycan-mimetics activate platelets via PEAR1 and PI3K β . *J Thromb Haemost* 21: 101–116.
<https://doi.org/10.1016/j.jtha.2022.10.008>
45. Chong BH, Ismail F (1989) The mechanism of heparin-induced platelet aggregation. *Eur J Haematol* 43: 245–251.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1989.tb00290.x>
46. Ahmed I, Majeed A, Powell R (2007) Heparin induced thrombocytopenia: diagnosis and management update. *Postgrad Med J* 83: 575–582.
<https://doi.org/10.1136/pgmj.2007.059188>
47. Brodard J, Alberio L, Angelillo-Scherer A, Nagler M (2020) Accuracy of heparin-induced platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res* 185: 27–30.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.11.004>
48. Cipriani TR, Gracher AH, de Souza LM, Fonseca RJ, Belmiro CL, Gorin PA, Sasaki GL, Iacomini M (2009) Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. *Thromb Haemost* 101: 860–866.
<https://doi.org/10.1160/TH08-08-0556>

-
49. Shen Q, Guo Y, Wang K, Zhang C, Ma Y (2023) A review of chondroitin sulfate's preparation, properties, functions, and applications. *Molecules* 28: 7093.
<https://doi.org/10.3390/molecules28207093>
 50. Sakai T, Kyogashima M, Kariya Y, Urano T, Takada Y, Takada A (2000) Importance of GlcUA β 1–3GalNAc(4S,6S) in chondroitin sulfate E for t-PA- and u-PA-mediated Glu-plasminogen activation. *Thromb Res* 100: 557–565.
[https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(00\)00365-0](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(00)00365-0)
 51. Maruyama T, Toida T, Imanari T, Yu G, Linhardt RJ (1998) Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation. *Carbohydr Res* 306: 35–43.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)10060-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)10060-X)
 52. Nader HB (1991) Characterization of a heparan sulfate and a peculiar chondroitin 4-sulfate proteoglycan from platelets. Inhibition of the aggregation process by platelet chondroitin sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 266: 10518–10523.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99255-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99255-0)
 53. Shen Q, Guo Y, Wang K, Zhang C, Ma Y (2023) A review of chondroitin sulfate's preparation, properties, functions, and applications. *Molecules* 28: 7093.
<https://doi.org/10.3390/molecules28207093>
 54. Strassenburg W, Józwicki J, Durślewicz J, Kuffel B, Kulczyk MP, Kowalewski A, Grzanka D, Drewa T, Adamowicz J (2022) Tumor cell-induced platelet aggregation as an emerging therapeutic target for cancer therapy. *Front Oncol* 12: 909767.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.909767>
 55. Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, Ogasawara S, Matsuura N, Hasegawa Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y, Narimatsu H (2008) Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci* 99: 54–61.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00634.x>
 56. Vandenbriele C, Sun Y, Criel M, Cludts K, Van Kerckhoven S, Izzi B, Vanassche T, Verhamme P, Hoylaerts MF (2016) Dextran sulfate triggers platelet aggregation via direct activation of PEAR1. *Platelets* 27: 365–372.
<https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1111321>
 57. Hlady V (1984) Adsorption of dextran and dextran sulfate on precipitated calcium oxalate monohydrate. *J Colloid and Interface Sci* 98: 373–384.
[https://doi.org/10.1016/0021-9797\(84\)90161-9](https://doi.org/10.1016/0021-9797(84)90161-9)

Effect of Biopolymers and Functionalized by Them Vaterite Microparticles on Platelet Aggregation

**D. V. Grigorieva^{a, #}, E. V. Mikhalechik^b, N. G. Balabushevich^{b, c}, D. V. Mosievich^c,
M. A. Murina^b, O. M. Panasenko^b, A. V. Sokolov^{b, d}, and I. V. Gorudko^a**

^a*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

^b*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical
Biological Agency, Moscow, Russia*

^c*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^d*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: dargr@tut.by

Vaterite microparticles, metastable form of calcium carbonate, are promising forms of delivery of medicinal compounds. For more efficient delivery of target molecules (increased incorporation and retention), vaterite microparticles must be functionalized with biopolymers. In this article the effect of polysaccharides, mucin and vaterite microparticles, as well as hybrid vaterite microparticles with the above-mentioned biopolymers was studied on platelet aggregation. It was found that fucoidan, heparin and dextran sulfate (when added to platelet-rich plasma) and mucin (when added to isolated platelets) initiated cell aggregation. Pectin and chondroitin sulfate inhibited ADP- and thrombin-induced aggregation in a dose-dependent manner, mucin suppressed ADP-induced, and dextran sulfate suppressed thrombin-induced platelet aggregation. Vaterite microparticles at a concentration of 100–1000 µg/ml did not affect the aggregation of isolated platelets, but caused 10–15% cell aggregation in plasma; at the same time, at a concentration of 1000 µg/ml vaterite microparticles prevented agonist-induced cell aggregation by ~30%. It has been established that hybrid vaterite microparticles with fucoidan or heparin, when added both to platelet-rich plasma and to isolated cells, are capable to initiate platelet aggregation. Vaterite microparticles functionalized with pectin or chondroitin sulfate had no effect on spontaneous cell aggregation, and did not affect (with chondroitin sulfate) or inhibit (with pectin) agonist-induced platelet aggregation. Thus, the use of hybrid vaterite microparticles with pectin or fucoidan/heparin may be promising for the delivery of drugs aimed at modulating (inhibition with pectin or activation with fucoidan/heparin) the platelet component of hemostasis.

Keywords: platelet, aggregation, vaterite microparticle, polysaccharide, mucin, adenosine diphosphate, thrombin

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АНТИДЕПРЕССАНТОВ ИМИПРАМИНА
И ФЛУОКСЕТИНА НА ЦИКЛ СОН – БОДРСТВОВАНИЕ И СОННЫЕ
ВЕРЕТЕНА У КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij С АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ
И КОМОРБИДНОЙ ДЕПРЕССИЕЙ**

© 2024 г. А. В. Габова¹*, Е. А. Федосова¹ К. Ю. Саркисова¹

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

* E-mail: agabova@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.04.2024 г.

После доработки 21.05.2024 г.

Принята к публикации 21.05.2024 г.

Крысы линии WAG/Rij являются валидной моделью абсансной эпилепсии и коморбидной депрессии. Ранее нами было показано, что у крыс линии WAG/Rij имеются нарушения цикла сон-бодрствование и изменения характеристик сонных веретен. Обнаружена также отрицательная корреляция между числом пик-волновых разрядов (ПВР) и длительностью быстрого (REM) сна. Клинические данные свидетельствуют о том, что традиционные антидепрессанты имипрамин и флуоксетин эффективно подавляют симптомы депрессии, но при этом могут оказывать негативное влияние на цикл сон-бодрствование и сопутствующую эпилепсию у пациентов. Наши предыдущие исследования у крыс линии WAG/Rij показали, что имипрамин при хроническом введении увеличивал число ПВР, в то время как флуоксетин в той же дозе уменьшал их число, хотя оба антидепрессанта оказывали выраженный антидепрессантный эффект. Сравнение влияния антидепрессантов имипрамина и флуоксетина на цикл сон-бодрствование и сонные веретена у крыс линии WAG/Rij остается неизученным. Цель данной работы – выяснить: 1) какое влияние оказывают имипрамин и флуоксетин на цикл сон-бодрствование и характеристики сонных веретен у крыс линии WAG/Rij и 2) имеются ли различия в их влиянии. Для достижения этой цели сравнивали характеристики цикла сон-бодрствование и сонных веретен у крыс линии WAG/Rij после хронического введения антидепрессантов и физраствора и у неэпилептических крыс Wistar. У крыс линии WAG/Rij введение имипрамина приводило к значимому уменьшению длительности REM сна. Введение имипрамина по сравнению с флуоксетином увеличивало также латентный период перехода ко сну и перехода к REM сну. Амплитуда сонных веретен значимо увеличивалась под действием обоих антидепрессантов. Однако спектральная плотность мощности «медленных» и «средних» веретен, которые преобладают у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar, была значимо больше после введения имипрамина, чем после введения флуоксетина. Результаты свидетельствуют о том, что имипрамин приводит к более выраженным негативным изменениям цикла сон-бодрствование и сонных веретен, чем флуоксетин. Исследования на модели крыс линии WAG/Rij указывают на то, что флуоксетин является более предпочтительным антидепрессантом для терапии депрессивных расстройств, коморбидной абсансной эпилепсии, так как он не вызывает существенного ухудшения качества сна. Эти результаты согласуются с клиническими данными.

Ключевые слова: антидепрессант, флуоксетин, имипрамин, абсансная эпилепсия, генетическая модель, коморбидная депрессия, крысы линии WAG/Rij, цикл сон-бодрствование, медленноволновой сон, быстрый сон, сонное веретено

DOI: 10.31857/S0869813924060115, **EDN:** ВЕНРКЗ

ВВЕДЕНИЕ

Крысы линии WAG/Rij являются генетической моделью абсансной эпилепсии и коморбидной депрессии [1–3]. Коморбидная депрессия в большей степени, чем сама по себе эпилепсия, ухудшает качество жизни больных эпилепсией людей. Поэтому для лечения коморбидных депрессивных расстройств используют антидепрессанты различных механизмов действия. Одни из них, как правило, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, могут подавлять сопутствующую эпилепсию, в то время как другие, в основном трициклические антидепрессанты, способны усугубить симптомы эпилепсии [4]. Эпилепсия и депрессия обычно сопровождаются нарушениями цикла сон-бодрствование. Ранее нами показано, что у крыс линии WAG/Rij по сравнению с неэпилептическими крысами Wistar имеется тенденция к уменьшению быстрого (REM) сна и увеличению медленноволнового (NREM) сна [5]. Относительная длительность REM сна у крыс линии WAG/Rij меньше, а длительность NREM сна больше, чем у неэпилептических крыс ACI [6]. Хотя некоторые авторы считают увеличение REM сна маркером депрессии [7], депрессивное состояние не всегда сопровождается увеличением REM сна. В работе [5] показано, что уменьшение симптомов абсансной эпилепсии и коморбидной депрессии у потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли метилбогащенную диету (МОД) в перинатальном периоде, сопровождается увеличением REM сна. Установлено, что трициклический антидепрессант кломипрамин, вводимый неонатально (с 8–21-го дня после рождения) в дозе 20 мг/кг крысам линии WAG/Rij, усиливает депрессивноподобное поведение, увеличивает количество REM сна и уменьшает число пик-волновых разрядов (ПВР) у животных в возрасте 8 месяцев [8]. На моделях депрессии у животных показано, что введение антидепрессантов дезипрамина, флуоксетина и циталопрама значительно уменьшает длительность REM сна у крыс линии Sprague–Dawley, в то время как у крыс линии Wistar–Kyoto флуоксетин не уменьшал длительность REM сна [9].

Имеются данные о нарушениях сна у пациентов, страдающих депрессией, что может сопровождаться тревожными расстройствами [10]. При депрессии у пациентов обычно наблюдают задержку в наступлении сна (увеличение латентного периода наступления сна), увеличение длительности сна до наступления REM сна (увеличение латентного периода быстрого сна) [11], увеличение числа пробуждений, уменьшение длительности NREM сна, увеличение длительности REM сна [12, 13]. Известно, что качество сна имеет большое значение для когнитивных и физиологических функций организма [10, 14]. Нарушения REM сна являются более специфичными для депрессии, чем для других психических заболеваний [15, 16]. Во время REM сна консолидируются недавно приобретенные знания и навыки. Процесс консолидации зависит от качества сна и необходим для формирования долговременной памяти. Дефицит REM сна может приводить к когнитивным нарушениям. Показано, что хотя имеется риск возникновения эпилептических разрядов, влияющих на сон, у пациентов, принимающих антидепрессанты [17, 18], прием флуоксетина в умеренных терапевтических (клинически эффективных) дозах не увеличивает риск возникновения разрядов [19]. Хроническое введение имипрамина крысам линии WAG/Rij увеличивало число ПВР, а введение флуоксетина уменьшало их [20].

Сонные веретена, так же как и ПВР, являются отражением таламокортикальной активности. Однако сонные веретена запускаются ретикулярным ядром таламуса, а ПВР возникают в соматосенсорной коре мозга [21]. Предположение, что разряды при абсансной эпилепсии являются патологическим изменением сонных веретен [22], было опровергнуто экспериментально введением антиабсансного препарата этосуксимид, который подавлял ПВР, но увеличивал число сонных веретен [23]. Показано, что после обучения у животных и человека увеличивается число и длительность сонных веретен (14–16 Гц), что коррелирует с улучшением выполнения выработанного навыка. На-

пример, у крыс, обучившихся выполнять условнорефлекторную реакцию одностороннего или двустороннего избегания, число сонных веретен увеличивалось, в то время как у крыс, не обучившихся навыку двустороннего избегания, характеристики сонных веретен не изменялись. Авторы полагают, что сонные веретена могут служить физиологическим показателем способности к обучению, а также маркером сохранности выработанного навыка или консолидации памяти [15]. Согласно гипотезе Born с соавт. [24], сонные веретена являются важным компонентом консолидации памяти, связанной с NREM сном. Исследователи предполагают, что медленные колебания запускают веретена таламуса одновременно с реактивацией в гиппокампе и что именно эти веретена NREM сна вызывают пластические изменения в неокортексе [24, 25]. Эпилептогенный процесс влияет на цикл сон-бодрствование и некоторые характеристики сонных веретен. Число «медленных» и «средних» веретен (с частотой 8–12.4 Гц) было больше у крыс линии WAG/Rij, в то время как у крыс Wistar, напротив, преобладали «быстрые» и «экстрабыстрые» веретена (с частотой 12.5–16 Гц) [26]. В нашей работе [5] было показано, что уменьшение симптомов абсансной эпилепсии и коморбидной депрессии у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли метилбогаченную диету (МОД), приводило к улучшению сна и снижению амплитуды и спектральной плотности мощности сонных веретен, приближая их к характеристикам сонных веретен у неэпилептических крыс Wistar.

Антидепрессант флуоксетин относится к селективным ингибиторам обратного захвата серотонина в синапсах нейронов ЦНС, что приводит к повышению концентрации серотонина в структурах головного мозга и увеличению длительности стимулирующего действия серотонина на нервную систему [27, 28]. Предполагается, что флуоксетин вызывает у пациентов ощущение бессонницы за счет увеличения числа периодических движений конечностей (periodic limb movement disorder) и частых пробуждений, связанных с движениями глаз. Однако по полисомнографическому и ЭМГ анализу не наблюдалось различий по общему времени сна, латентности сна и другим характеристикам стадий сна [29].

Имипрамин проявляет высокую антидепрессантную эффективность даже в случаях наиболее тяжелых форм депрессии и довольно часто вызывает маниакальные и гипоманиакальные реакции [30]. По механизму действия имипрамин также является ингибитором обратного захвата моноаминов, в том числе серотонина, дофамина и норадреналина. Он обладает холинолитической активностью [31, 32]. У крыс-самцов линии OFA, проявляющих умеренные нарушения в обучении и памяти, после однократного введения милнаципрана, близкого по стимулирующему эффекту к имипрмину, наблюдали статистически значимое снижение общей продолжительности REM сна. Количество эпизодов REM сна уменьшилось, а их продолжительность увеличилась [33]. Введение имипрамина крысам линии WAG/Rij может приводить к значительному увеличению числа абсансных разрядов вплоть до возникновения абсансного статуса и фокального миоклонуса [20]. Среди наиболее частых побочных эффектов антидепрессантов являются проблемы, связанные со сном [34]. Нами было показано, что влияние донора метильных групп – L-метионина, сопоставимо с положительным антидепрессантным действием имипрамина и флуоксетина [35]. Влияние имипрамина и флуоксетина на цикл сон-бодрствование у крыс линии WAG/Rij до сих пор не исследовалось. Различные антидепрессанты, в том числе имипрамин и флуоксетин, могут оказывать разное влияние на симптомы эпилепсии и коморбидной депрессии [4], что, в свою очередь, может вызвать разные изменения характеристик цикла сон-бодрствование и сонных веретен у крыс линии WAG/Rij.

Цель данной работы – выяснить: 1) какое влияние оказывают антидепрессанты имипрамин и флуоксетин на цикл сон-бодрствование и характеристики сонных веретен у крыс линии WAG/Rij и 2) имеются ли различия в их влиянии. Для достижения этой цели у крыс линии WAG/Rij, которым хронически вводили имипрамин, флуоксе-

тин и физраствор, и у неэпилептических крыс Wistar исследовали относительную (%) и абсолютную (мин) длительность стадий сна, число их эпизодов, число переходов от NREM сна к бодрствованию и REM сну, латентный период наступления сна (длительность бодрствования до засыпания), латентный период REM сна (длительность периода от засыпания до 1-го эпизода REM сна), а также амплитуду, индекс асимметрии и спектральную плотность мощности сонных веретен NREM сна.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 6–7-месячных крысах-самцах линии WAG/Rij, валидной модели генетической абсансной эпилепсии с коморбидной депрессией, и неэпилептических крысах Wistar аналогичного возраста. Все животные содержались в стандартных условиях вивария с 12-часовым циклом свет – темнота (свет в 8.00). Все крысы линии WAG/Rij, использованные в эксперименте, имели ПБВ на ЭЭГ, характерные для абсансной эпилепсии (рис. 1а). У всех крыс Wistar, которых мы использовали в качестве неэпилептического контроля, абсансные разряды на ЭЭГ отсутствовали (рис. 1б). Все животные обеих линий не были чувствительны к аудиогенным воздействиям [36].

Живление электродов (миниатюрные винтики из нержавеющей стали) в кости черепа выполняли под хлоралгидратной анестезией (400 мг/кг, в/б). На 5-й день после операции начинали введение препаратов. Исследованы 4 группы крыс: 1) крысы линии WAG/Rij, которым вводили физраствор ($n = 6$), 2) крысы линии WAG/Rij, которым вводили флуоксетин (Fluoxetine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) в дозе 20 мг/кг ($n = 6$), 3) крысы линии WAG/Rij, которым вводили имипрамин (Imipramine hydrochloride, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) в дозе 15 мг/кг ($n = 6$), 4) крысы Wistar ($n = 7$). В данной работе мы использовали крыс Wistar в качестве эталона «нормы», т.е. как еще одну контрольную группу (контроль 2, «норма») к крысам линии WAG/Rij, которым вводили физраствор (контроль 1). Поскольку у крыс Wistar отсутствуют симптомы абсанс-эпилепсии и депрессии, характеристики цикла сон-бодрствование и сонных веретен у этих животных считали показателями «нормы». Препараты вводили внутривенно в течение 14 дней. Согласно нашим данным, в указанных дозах и длительности введения флуоксетин и имипрамин оказывают примерно одинаково выраженный антидепрессантный эффект у крыс линии WAG/Rij. Так, длительность иммобильности в тесте вынужденного плавания после введения имипрамина в дозе 15 мг/кг составляла 83.8% по сравнению с длительностью иммобильности после введения физраствора, принятой за 100%, а после введения такой же дозы флуоксетина – 84.9%. Другими словами, длительность иммобильности после введения имипрамина и флуоксетина уменьшалась на ~16% и ~15% соответственно от контрольного уровня, принятого за 100% [20]. ЭЭГ регистрировали у свободно передвигающихся животных с 16.00 до 19.00 ч (3 ч в день) эпидурально с фронтальных (AP +2 мм, L 2.5 мм) и окципитальных (AP –6 мм, L 4 мм) отделов коры. Для записи ЭЭГ использовали 8-канальный беспроводной усилитель биопотенциалов 'BR8V1' (Texas Instruments, США). Регистрацию ЭЭГ проводили в соответствии с ранее описанной методикой [37], монополярно, референтный электрод устанавливали над мозжечком. Частота дискретизации записи ЭЭГ составляла 250 Гц, ЭЭГ регистрировали без фильтрации. Для анализа ЭЭГ применялась полоса пропускания от 1 до 40 Гц. Анализировали ЭЭГ, зарегистрированную во фронтальной коре мозга, в которой ПБВ имеют максимальную амплитуду и наиболее отчетливые морфологические характеристики, а фронтальные сонные веретена (frontal anterior spindles) имеют хорошо выраженные изменения. Записи ЭЭГ с окципитальной коры мозга необходимы для более точного определения стадии REM сна, так как в ней более четкий, чем во фронтальной коре, тета-ритм во время быстрого сна. Записи ЭЭГ проводили во второй половине дня, так как у крыс линии WAG/Rij в это время наблюдают наибольшее число ПБВ, а характеристики цикла сон-

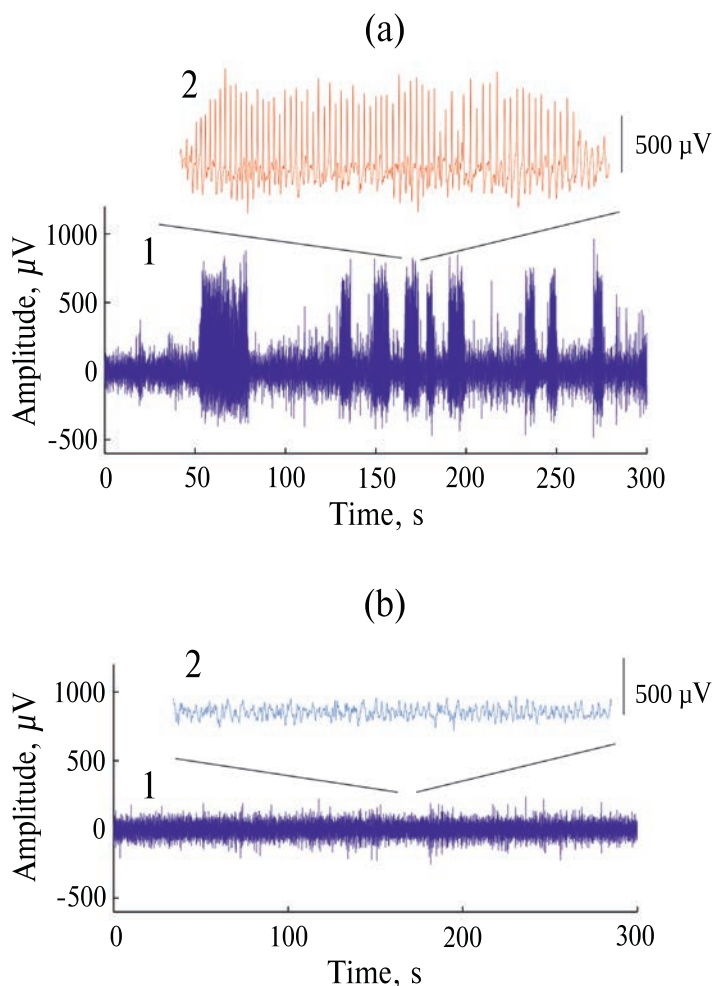


Рис. 1. Примеры записей ЭЭГ пассивного бодрствования, иллюстрирующие наличие ПБР у крыс линии WAG/Rij (a) и отсутствие ПБР у крыс Wistar (b). (a): 1 – запись ЭЭГ крысы линии WAG/Rij с серией ПБР; 2 – один из ПБР длительностью 10 с представлен на расширенной по времени шкале. (b): 1 – ЭЭГ крысы Wistar без ПБР; 2 – один из фрагментов записи ЭЭГ крысы Wistar длительностью 10 с представлен на расширенной по времени шкале.

бодрствование и сонных веретен NREM сна в большей степени изменены [6]. Стадии сна и бодрствования определялись экспертом при просмотре записей ЭЭГ в соответствии с критериями, приведенными для крыс линии WAG/Rij в работе [6]. Состояние бодрствования сопровождалось активностью ЭЭГ с доминированием тета- (6–8 Гц) и бета-(20–40 Гц) частот. Легкий NREM сон определяли как ЭЭГ активность, содержащую сонные веретена с частотой 10–16 Гц, тета-волны и медленные волны (2–4 Гц). Постепенно исчезающие сонные веретена и увеличивающееся число медленных дельта-волн (1.5–4 Гц) характеризовали как глубокий NREM сон. REM сон определяли как непрерывную тета-активность (6–8 Гц), возникающую после NREM сна. REM сон

отличается от стадии бодрствования отсутствием бета-частот и двигательных реакций, нерегулярным дыханием и подергиваниями животного. Стадии цикла сон-бодрствование считали одним эпизодом, если они прерывались не более, чем на 15 с. Латентный период сна вычислялся от начала эпизода бодрствования до засыпания животного (мин). Латентный период REM сна вычислялся от начала эпизода NREM сна до начала REM сна (мин). Число и длительность эпизодов стадий цикла сон-бодрствование измерялись полуавтоматически. Вычисляли среднее число эпизодов (n), их абсолютную (мин) и относительную (%) длительность на протяжении всей записи. Вычисляли число переходов из стадии NREM сна в стадии REM сна и в бодрствование. Для последующего анализа в NREM сне выделяли сонные веретена. По сравнению с дельта-волнами они отличались увеличенной амплитудой (до 800 мкВ) и основной частотой (от 8 до 16 Гц). Усреднённый спектр мощности сонных веретен вычислялся из спектров Фурье, построенных методом Уэлча (окно Хэннинга, ширина окна 2 с, перекрытие окна 7/8). Для сравнения групп спектров сонных веретен использовался групповой статистический тест Манна-Уитни (альфа-уровень 0.05) с поправкой Бонферрони на число значений в спектре и число парных сравнений. Применялась программа Procedure (автор А. А. Морозов, Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН). Для построения спектров брали выборку из 50–60 сонных веретен в каждой группе крыс. Также вычисляли средние значения амплитуды и коэффициента асимметрии сонных веретен. Для вычисления средних значений брали по 30–35 сонных веретен в каждой группе. Амплитуда и коэффициент асимметрии сонных веретен определяли полуавтоматическим способом с помощью программы HILB4 (автор А. А. Морозов, Институт радиотехники и электроники им. В. А. Котельникова РАН). Исходные данные были закодированы в формате edf. С помощью программы на кривой сонного веретена вручную отмечались локальные минимумы и максимумы. Значения минимумов и максимумов автоматически передавались в программу Матлаб в виде двух векторов отрицательных и положительных чисел, обозначающих расстояние локального минимума или максимума относительно нулевой линии в мкВ. Амплитуда веретена определялась как сумма абсолютных значений локального максимума и локального минимума сонного веретена. Для каждой группы рассчитывали среднюю амплитуду сонных веретен.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета статистических программ “STATISTICA Release 7”. Тип распределения исследуемых показателей и степень его близости к нормальному определяли по критериям Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорса (Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors test). Если распределение показателя соответствовало критерию нормальности, использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим определением значимости различий средних значений показателей между группами по post-hoc критерию Ньюмена-Кейлса (Newman-Keuls test). В случае несоответствия критерию нормальности применяли непараметрический аналог ANOVA – Kruskal-Wallis H test (one-way ANOVA by ranks) с последующим определением значимости различий между группами с использованием множественного сравнения (Multiple comparisons of mean ranks for all groups) или критерия U Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Данные на графиках представлены в виде среднего значения и ошибки среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) показал значимость влияния фактора «группа» на относительную длительность (%) стадии бодрствования ($F(3,20) = 10.7, p < 0.001$). Относительная длительность стадии бодрства-

ния у крыс линии WAG/Rij, которым вводили флуоксетин и имипрамин, была значимо больше, чем у крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор. Значимых различий между флуоксетином и имипрамином в их влиянии на относительную длительность бодрствования не обнаружено. Фактор «препарат» оказывал значимое влияние на относительную длительность NREM сна ($F(3,20) = 9.3, p < 0.001$). Относительная длительность NREM сна у крыс линии WAG/Rij, которым вводили имипрамин и флуоксетин, была значимо меньше по сравнению с крысами линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, и крысами Wistar. Значимых различий в эффектах флуоксетина и имипрамина на относительную длительность NREM сна не выявлено.

Фактор «группа» оказывал значимое влияние на относительную длительность REM сна ($F(3,20) = 7.0, p < 0.01$). Относительная длительность REM сна у крыс линии WAG/Rij, которым вводили имипрамин, была значимо меньше, чем у крыс линии WAG/Rij, получавших физраствор, и у крыс Wistar. Относительная длительность REM сна у крыс линии WAG/Rij, которым вводили флуоксетин, была значимо меньше, чем у крыс Wistar. Относительная длительность быстрого сна у крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор была значимо меньше, чем у крыс Wistar (рис. 2).

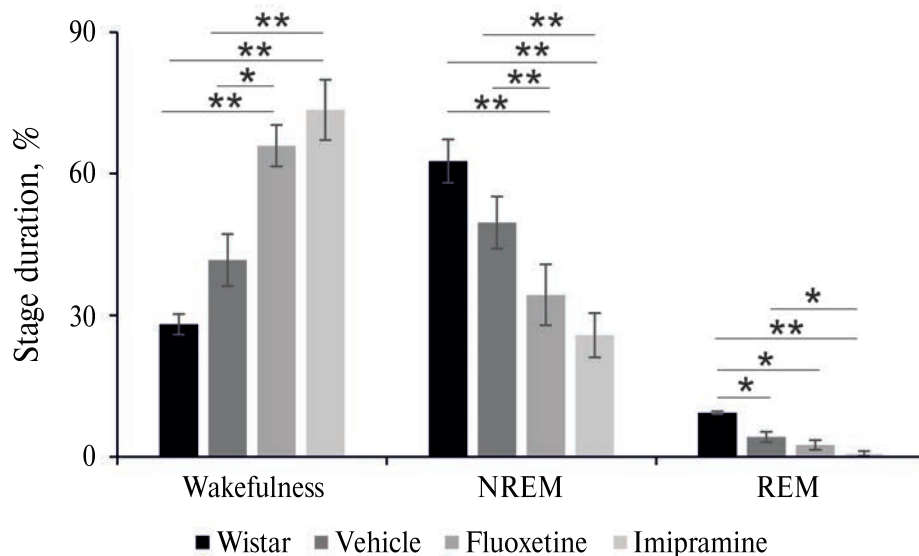


Рис. 2. Относительная (%) длительность стадий цикла сон-бодрствование у крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij, которым хронически вводили физраствор (Vehicle) и антидепрессанты флуоксетин (Fluoxetine) и имипрамин (Imipramine). Wakefulness – бодрствование, NREM – медленноволновый сон, REM – быстрый сон.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Горизонтальные линии обозначают сравниваемые группы.

Фактор «группа» оказывал значимое влияние на абсолютную (мин) длительность эпизодов бодрствования ($F(3,20) = 3.4, p < 0.05$). Длительность эпизодов бодрствования у крыс линии WAG/Rij, которым вводили имипрамин, была значимо больше, чем у крыс линии Wistar и у крыс линии WAG/Rij, получавших физраствор. Длительность эпизодов бодрствования у крыс линии WAG/Rij, которым вводили флуоксетин, не отличалась от крыс линии Wistar и крыс линии WAG/Rij с введением физраствора. Длительность эпизодов бодрствования у крыс линии WAG/Rij, которым вводили физ-

раствор, была значимо меньше по сравнению с крысами Wistar и крысами линии WAG/Rij с введением имипрамина.

Фактор «группа» не оказывал значимого влияния на длительность NREM сна ($H(3,24) = 6.3, p = 0.1$). Длительность эпизодов NREM сна у всех исследуемых групп крыс не отличалась.

Фактор «группа» оказывал значимое влияние на длительность REM сна ($F(3,20) = 3.9, p < 0.05$). У крыс линии WAG/Rij, которым вводили имипрамин и флуоксетин, длительность эпизодов REM сна была значимо меньше, чем у крыс Wistar и не отличалась от крыс линии WAG/Rij, с введением физраствора. Значимых различий в эффектах имипрамина и флуоксетина на длительность эпизодов REM сна не обнаружено (рис. 3).

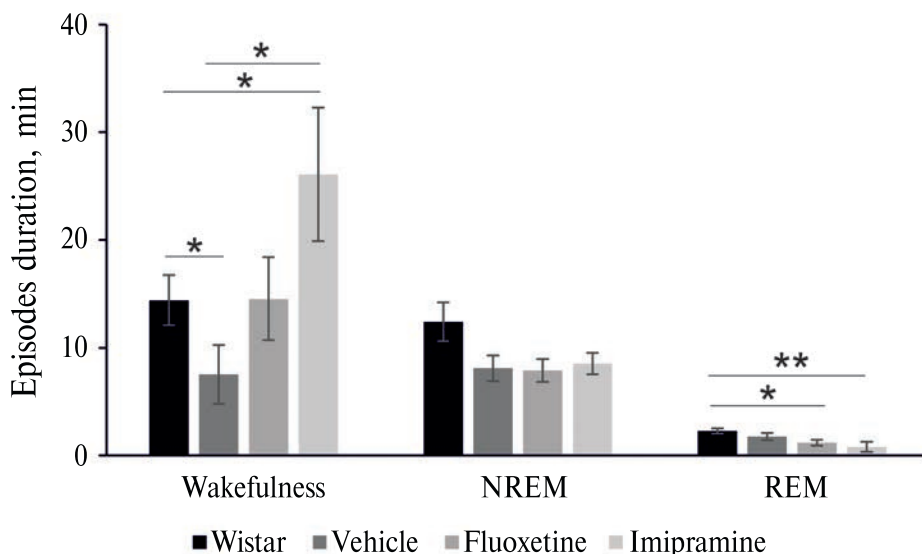


Рис. 3. Длительность (мин) эпизодов стадий цикла сон-бодрствование у крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij, которым хронически вводили физраствор и антидепрессанты флуоксетин и имипрамин.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Остальные обозначения как на рис. 2.

Фактор «группа» оказывал значимое влияние на число эпизодов бодрствования ($H(3, 24) = 15.7, p < 0.01$). У всех групп крыс линии WAG/Rij число эпизодов бодрствования было значимо больше числа эпизодов бодрствования у крыс Wistar. Число эпизодов бодрствования у крыс линии WAG/Rij, которым вводили имипрамин, было значимо меньше числа эпизодов у крыс линии WAG/Rij, получавших физраствор и флуоксетин. Фактор «препарат» был значимым для числа эпизодов NREM сна ($H(3, 24) = 11.8, p < 0.01$). Число эпизодов NREM сна было значимо меньше при введении имипрамина по сравнению с флуоксетином, физраствором и крысами Wistar. Число эпизодов NREM сна при введении флуоксетина было значимо больше, чем у крыс Wistar. Фактор «группа» оказывал значимое влияние на число эпизодов REM сна ($H(3, 24) = 12.5, p < 0.01$). Число эпизодов REM сна у крыс линии WAG/Rij было значимо меньше при введении имипрамина по сравнению с флуоксетином и другими группами крыс (рис. 4).

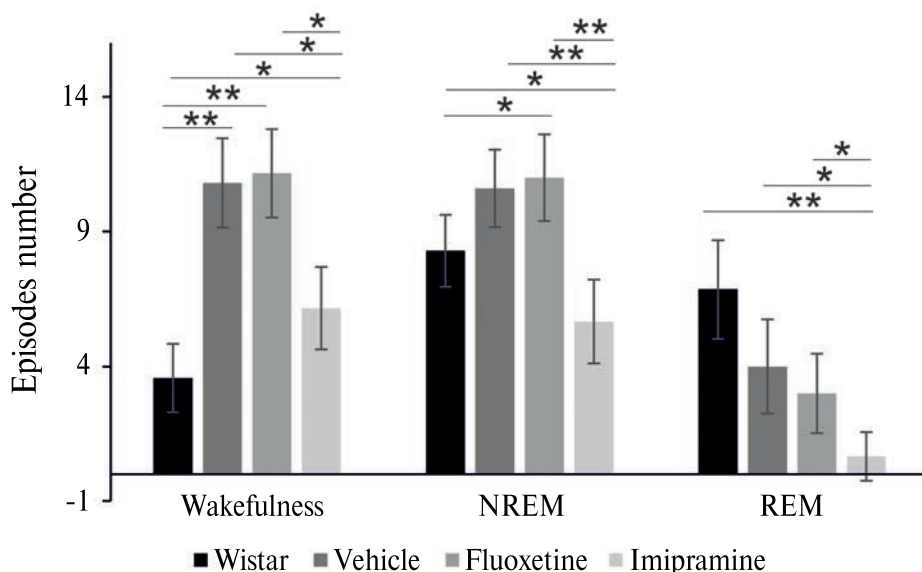


Рис. 4. Число эпизодов стадий цикла сон-бодрствование у крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij, которым хронически вводили физраствор и антидепрессанты флуоксетин и имипрамин.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Остальные обозначения как на рис. 2.

Фактор «группа» оказывал значимое влияние на общее число переходов из REM сна в другие стадии сна ($F(3,20) = 5.3$, $p < 0.01$), на число переходов от NREM сна к REM сну ($F(3,20) = 3.4$, $p < 0.05$) и от NREM сна к бодрствованию ($F(3,20) = 15.4$, $p < 0.001$). Общее число переходов из NREM сна в другие стадии цикла сон-бодрствование у крыс линии WAG/Rij, которым вводили флуоксетин, было значимо больше аналогичного показателя у крыс Wistar. Общее число переходов у крыс линии WAG/Rij, которым вводили имипрамин, было значимо меньше, чем у крыс линии WAG/Rij с введением флуоксетина и физраствора. Число переходов от NREM к REM сну было значимо меньше под влиянием имипрамина по сравнению с флуоксетином, а также крысами линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, и крысами Wistar. Число переходов от NREM сна к бодрствованию у крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, флуоксетин и имипрамин, было значимо больше, чем у крыс Wistar. У крыс, которым вводили имипрамин, было значимо меньше переходов от NREM сна к бодрствованию по сравнению с крысами линии WAG/Rij, получавшим флуоксетин (рис. 5).

Обнаружено значимое влияние фактора «группа» на латентный период наступления сна ($H(3,24) = 10.8$, $p < 0.05$). Он был значимо больше у крыс линии WAG/Rij, которым вводили имипрамин, по сравнению с крысами Wistar и крысами линии WAG/Rij с введением физраствора. Латентный период наступления сна не различался у крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор и флуоксетин. Латентный период до наступления REM сна не различался у крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор. Он был значимо больше у крыс линии WAG/Ri с введением флуоксетина и имипрамина по сравнению с крысами Wistar. Латентный период до наступления REM сна у крыс линии WAG/Rij с введением имипрамина был значимо больше, чем у крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор и флуоксетин (табл. 1).

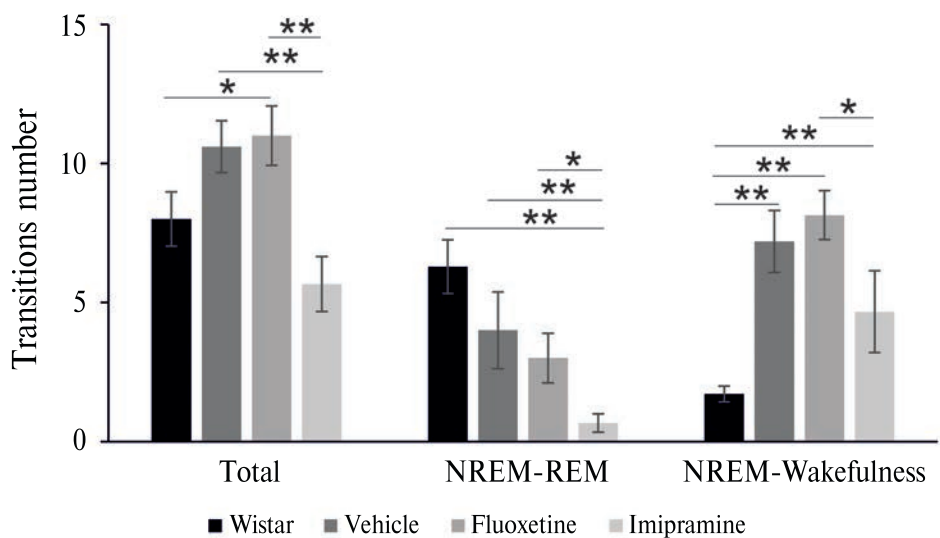


Рис. 5. Общее число переходов из NREM сна в другие стадии сна (Total), число переходов от NREM сна в стадии REM сна (NREM-REM) и бодрствования (NREM-Wakefulness) у четырех групп крыс: крысы Wistar, крысы линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, антидепрессанты флуоксетин и имипрамин.
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Остальные обозначения как на рис. 2.

Таблица 1. Латентный период наступления сна (Sleep latency) и наступления REM сна (REM latency) у крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, флуоксетин и имипрамин

Группа	Число крыс	Время до наступления сна, мин	Время до наступления быстрого сна, мин
Wistar	7	14.4 ± 2.3	61.0 ± 8.4
WAG/Rij, физраствор	5	8.1 ± 1.2	58.8 ± 11.1
WAG/Rij, флуоксетин	6	14.5 ± 3.8	100.4 ± 18.8*
WAG/Rij, имипрамин	6	25.8 ± 4.6***#	142.4 ± 7.1***#

Средние значения ± ошибка среднего ($M \pm m$). * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с крысами Wistar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с крысами линии WAG/Rij, которым вводили физраствор. # $p < 0.05$ у крыс с введением имипрамина по сравнению с животными с введением флуоксетина.

Фактор «группа» оказывал значимое влияние на амплитуду сонных веретен ($F(3,107) = 18.5, p < 0.001$), но не влиял на индекс асимметрии ($H(3,111) = 4.1, p = 0.26$). Средняя амплитуда сонных веретен у крыс линии WAG/Rij, которым вводили флуоксетин и имипрамин, была значимо больше, чем у крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij с введением физраствора. Амплитуда сонных веретен у крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, была значимо больше, чем у крыс Wistar. Средняя амплитуда сонных веретен у крыс, получавших флуоксетин и имипрамин, не различалась. Значимого влияния антидепрессантов на индекс асимметрии сонных веретен не выявлено (табл. 2).

Таблица 2. Средняя амплитуда и индекс асимметрии сонных веретен у неэпилептических крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор и антидепрессанты флуоксетин и имипрамин

Группа	Амплитуда, мкВ	Индекс асимметрии, %
Wistar	277.0 ± 9.5	52.8 ± 2.3
WAG/Rij, физраствор	377.1 ± 14.0 ⁺⁺	55.4 ± 1.0
WAG/Rij, флуоксетин	434.3 ± 18.7 ^{+++*}	54.8 ± 1.2
WAG/Rij, имипрамин	464.0 ± 24.5 ^{++++*}	54.5 ± 1.1

Средние значения ± ошибка среднего ($M \pm m$). ⁺⁺ $p < 0.01$, ⁺⁺⁺ $p < 0.001$ по сравнению с крысами Wistar.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с крысами линии WAG/Rij, которым вводили физраствор.

Анализ усредненной спектральной плотности мощности сонных веретен у крыс линии WAG/Rij, которым вводили антидепрессанты, показал ее увеличение по сравнению с сонными веретенами у крыс Wistar на всем диапазоне исследованных частот. По сравнению с крысами линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, наблюдали значимое уменьшение спектральной плотности мощности сонных веретен под влиянием антидепрессантов на частотах дельта- и тета-диапазона и ее увеличение в бета-диапазоне. Спектральная плотность мощности сонных веретен у крыс, которым вводили имипрамин, значительно превосходила мощность сонных веретен у крыс с введением флуоксетина на частоте «медленных» и «средних» веретен (7–11 Гц). У крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, спектральная мощность сонных веретен была значимо больше, чем у крыс Wistar на частотах 2–2.5, 5–9.5 Гц (рис. 6).

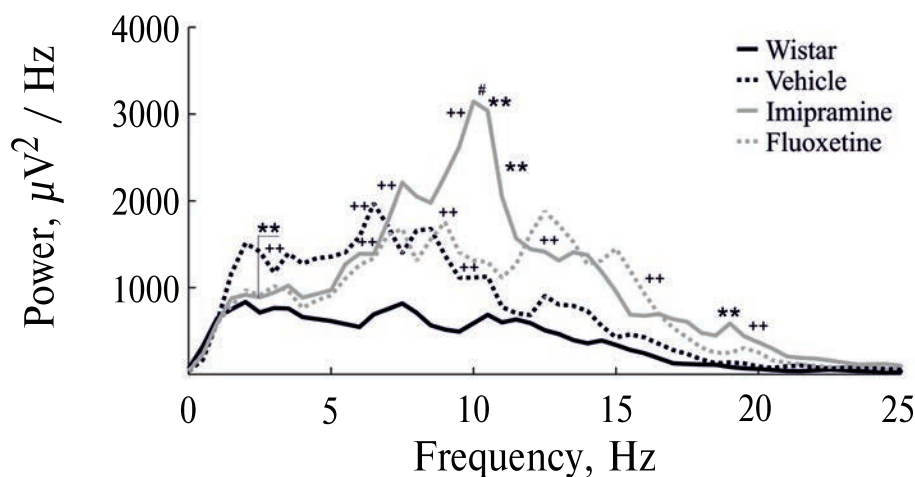


Рис. 6. Усредненные спектры мощности сонных веретен у крыс Wistar и крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, антидепрессанты флуоксетин и имипрамин. Данные вычислены методом Уэлча (Welch test) с использованием быстрого преобразования Фурье. Значимость различий определяли с помощью U теста Манна-Уитни с поправкой Бонферрони (312) на количество частот (52) в спектре и число сравнений (8). ⁺⁺ $p < 0.01$ по сравнению с крысами Wistar: при введении флуоксетина на частотах 8.5–9, 12–22.5 Гц; при введении имипрамина на частотах 6–25 Гц; при введении физраствора на частотах 2–2.5, 5–9.5 Гц. ** $p < 0.01$ по сравнению с введением физраствора и при введении имипрамина на частотах 2–2.5, 11–11.5, 18.5–20.5. # $p < 0.05$, введение имипрамина по сравнению с введением флуоксетина на частотах 7–11 Гц.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнение цикла сон-бодрствование у крыс линии WAG/Rij, которым вводили антидепрессанты имипрамин и флуоксетин или физраствор, с крысами Wistar показывает, что введение имипрамина приводит к значимому уменьшению длительности REM сна, что согласуется с имеющимися данными о влиянии введения имипрамина на REM сон у крыс линии OFA [33]. Ранее было установлено, что флуоксетин не уменьшает REM сон у крыс линии Wistar-Kyoto [9]. Эти данные аналогичны результатам, полученным в настоящем исследовании – флуоксетин не уменьшал относительную представленность REM сна, число и длительность его эпизодов по сравнению с введением физраствора. Показано, что имипрамин и флуоксетин уменьшают длительность REM сна у пациентов с депрессией [39]. Однако уменьшение REM сна под действием флуоксетина было менее выражено по сравнению с имипрамином. Клинические исследования показали, что флуоксетин вызывает уменьшение REM сна у больных депрессией людей всего лишь на 2–5% [40].

Изменения сна при эпилепсии часто связывают с увеличением числа разрядов, вызываемых приемом антидепрессантов. Данные клиники указывают на то, что прием флуоксетина в терапевтических дозах не увеличивает риск возникновения эпилептических разрядов у пациентов с депрессивными расстройствами [19]. Флуоксетин, по мнению клиницистов, является одним из самых безопасных антидепрессантов, вызывающих эпилептические разряды [41]. С другой стороны, хронический пероральный прием флуоксетина крысами линии WAG/Rij в возрасте 6 месяцев в дозе 10 и 30 мг/кг в день в течение 7 недель значимо увеличивал число абсансных разрядов. В то же время раннее длительное (в течение 17 недель) введение флуоксетина уменьшало число ПБР у взрослых крыс линии WAG/Rij [42]. Различие в числе разрядов и их влиянии на цикл сон-бодрствование может зависеть от длительности введения антидепрессантов. В настоящей работе антидепрессанты вводили в течение 14 дней. В наших предыдущих исследованиях установлено, что данная длительность введения достаточна для проявления антидепрессантного эффекта у препаратов с различными механизмами действия [1, 20]. Как показано в настоящей работе, введение флуоксетина уменьшало длительность REM сна у крыс линии WAG/Rij только по сравнению с крысами Wistar. Введение имипрамина и флуоксетина вызывало значимое уменьшение относительной длительности NREM сна и увеличение бодрствования по сравнению с крысами линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, и крысами Wistar. При введении имипрамина и флуоксетина изменялась также структура цикла сон-бодрствование: длительность и число эпизодов сна, число переходов от NREM сна к бодрствованию и REM сну, латентный период сна и REM сна. Изменения зависели от типа антидепрессанта. У крыс линии WAG/Rij латентный период до начала сна при введении трициклического антидепрессанта имипрамина был значимо больше, чем при введении флуоксетина, физраствора и у крыс Wistar, что свидетельствует о нарушениях процесса засыпания. Латентный период REM сна при введении имипрамина был также значимо больше латентного периода REM сна при введении флуоксетина, что указывает на более выраженное нарушение сна, вызываемое трициклическим антидепрессантом.

Ранее нами было установлено, что хроническое введение имипрамина в дозе 15 мг/кг, которая была использована также в данной работе, увеличивает число ПБР у крыс линии WAG/Rij [20]. В нашей предыдущей работе на крысах линии WAG/Rij [5] показана отрицательная корреляция между числом ПБР и длительностью REM сна. В той же работе обнаружено увеличение количества REM сна у потомства крыс линии WAG/Rij, матери которых потребляли МОД в перинатальном периоде. МОД матери приводила к уменьшению числа ПБР и подавлению поведенческих симптомов депрессии у животных [5]. Показано, что неонатальное введение (8–21 день после рождения) трициклического антидепрессанта кломипрамина в дозе 20 мг/кг крысам линии WAG/

Rij, увеличивает количество REM сна и уменьшает число ПБР у животных в возрасте 8 месяцев [8]. Данные, полученные у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij с использованием МОД матери во время перинатального периода [5], и результаты с неонатальным введением кломипрамина [8] свидетельствуют о том, что введение веществ с антидепрессантными свойствами на ранних стадиях развития может одновременно уменьшать число ПБР и увеличивать REM сон у взрослых крыс. Увеличение числа ПБР у крыс линии WAG/Rij под влиянием имипрамина [20] может являться одной из причин уменьшения длительности REM сна. Тот факт, что флуоксетин в использованной дозе и длительности введения не приводил к увеличению числа ПБР у крыс линии WAG/Rij, видимо, может частично объяснить его более слабое влияние на REM сон. Различие в нейрохимических механизмах действия этих двух антидепрессантов может также вносить свой вклад в их влияние на REM сон. Данные настоящей работы о том, что трициклический антидепрессант имипрамин вызывает более сильное подавление REM сна у крыс линии WAG/Rij по сравнению с селективным ингибитором обратного захвата серотонина флуоксетином, согласуются с данными клиники [43].

У крыс линии WAG/Rij при введении антидепрессантов длительность NREM сна уменьшалась по сравнению с крысами Wistar и крысами линии WAG/Rij, которым вводили физраствор. Между крысами Wistar и крысами линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, различия в длительности NREM сна отсутствовали. В то же время имеются данные об уменьшении NREM сна у пациентов с депрессией [12, 13].

В нашей предыдущей работе было показано, что уменьшение симптомов абсансной эпилепсии (уменьшение числа ПБР) и коморбидной депрессии у потомства крыс WAG/Rij, матери которых в перинатальном периоде потребляли МОД, приводило к уменьшению амплитуды и усредненной спектральной плотности мощности сонных веретен [5]. Эти изменения свидетельствовали о приближении характеристик сонных веретен к норме (характеристикам сонных веретен у неэпилептических крыс Wistar). Другими словами, результаты этих исследований указывают на то, что уменьшение амплитуды и спектральной плотности мощности сонных веретен во время NREM сна может служить показателем уменьшения тяжести патологии, то есть эффективности терапевтического воздействия. В пользу этого предположения свидетельствуют данные клинических исследований, продемонстрировавших, что независимо от вида медикаментозной терапии у пациентов, чувствительных к антидепрессантной терапии, снижалась исходно повышенная мощность веретен в диапазоне 14–16 Гц во время NREM сна, в то время как у пациентов, резистентных к терапии, указанные изменения частотного спектра не наблюдали [47].

Данные литературы свидетельствуют о том, что эпилепсия и депрессия, а также фармакологическая терапия этих заболеваний оказывают существенное влияние на амплитудные и частотные характеристики сонных веретен. Клинические исследования показали, что у пациентов с фокальной эпилепсией, резистентной к фармакотерапии, амплитуда сонных веретен больше, чем у контрольной группы без эпилепсии. У больных эпилепсией по сравнению с контролем было обнаружено также значительное увеличение спектров мощности сонных веретен в диапазоне частот 10.77–12.00 Гц. Прием противосудорожных препаратов (бензодиазепины, модуляторы кальциевых каналов) вызывал еще большее увеличение спектральной плотности мощности сонных веретен в этом диапазоне частот [44]. У пациентов с депрессией при фармакотерапии «медленные» (11.0–12.5 Гц) сонные веретена в NREM сне, особенно во фронтальной коре, были больше по амплитуде, чем у здоровых добровольцев. Кроме того, у них была больше спектральная мощность «быстрых» и «медленных» веретен по сравнению со здоровыми испытуемыми [45]. Увеличенная амплитуда сонных веретен обнаружена также у нелеченных депрессивных больных по сравнению с контрольной группой. Кратковременная антидепрессантная терапия не оказывала существенного влияния на амплитуду сонных веретен, а долгосрочная увеличивала их длительность [46].

В данном исследовании установлено, что у эпилептических крыс линии WAG/Rij амплитуда сонных веретен больше, чем у неэпилептических крыс Wistar. Антидепрессанты имипрамин и флуоксетин вызывали одинаково выраженное увеличение амплитуды сонных веретен у крыс линии WAG/Rij. Однако влияние этих антидепрессантов на спектральную плотность мощности сонных веретен было различным. Несмотря на то, что имипрамин и флуоксетин увеличивали усредненную спектральную плотность мощности сонных веретен по сравнению с крысами Wistar на всем диапазоне исследованных частот, имипрамин по сравнению с флуоксетином значимо увеличивал спектральную плотность мощности сонных веретен во время NREM сна в диапазоне частот 7–11 Гц. В этом диапазоне частот спектральная плотность мощности сонных веретен при введении имипрамина достигала максимальной величины, которая в ~ 6 раз превышала мощность веретен у неэпилептических крыс Wistar, в ~ 3 раза мощность веретен у крыс линии WAG/Rij, которым вводили физраствор, и в ~ 2.5 раза мощность веретен при введении флуоксетина. Кроме того, имипрамин также увеличивал число ПБР [20], что свидетельствует об усилении тяжести абсансной эпилепсии. Эти данные позволяют предположить, что увеличение спектральной плотности мощности сонных веретен в диапазоне 7–11 Гц, вызываемое антидепрессантом, может служить показателем его проэпилептического действия. Другими словами, спектральная плотность мощности сонных веретен NREM сна в диапазоне 7–11 Гц может быть использована в качестве биомаркера благоприятного или неблагоприятного эффекта антидепрессантной терапии на сопутствующую эпилепсию. Уменьшение спектральной мощности в этом частотном диапазоне может указывать на благоприятный (антиэпилептический) эффект, в то время как увеличение спектральной мощности – на неблагоприятный (проэпилептический). Необходимы дальнейшие исследования с использованием антидепрессантов с другими механизмами действия, чтобы проверить данное предположение.

Таким образом, антидепрессанты имипрамин и флуоксетин оказывают существенное влияние на цикл сон-бодрствование и сонные веретена у крыс линии WAG/Rij. Имипрамин по сравнению с флуоксетином вызывает более выраженное нарушение структуры цикла сон-бодрствование у крыс линии WAG/Rij: увеличение латентного периода засыпания и наступления REM сна, уменьшение длительности REM сна, числа эпизодов NREM и REM сна, а также числа переходов от NREM к REM сну. Имипрамин по сравнению с флуоксетином также значимо увеличивает спектральную плотность мощности сонных веретен во время NREM сна в диапазоне частот 7–11 Гц. Предполагается, что нарушение цикла сон-бодрствование и изменение характеристик сонных веретен NREM сна у крыс линии WAG/Rij, вызываемые антидепрессантной терапией, являются следствием их влияний на функционирование кортико-таламо-кортикальной системы.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что при выборе антидепрессанта, оказывающего менее выраженное негативное влияние на качество сна, флуоксетин является более предпочтительным по сравнению с имипрамином. Эти данные, полученные у крыс линии WAG/Rij – генетической модели депрессии, коморбидной абсансной эпилепсии, согласуются с результатами, полученными на пациентах с депрессивными расстройствами [43].

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К. Ю. С.), сбор данных (А. В. Г., Ф. Е. А.) обработка данных (А. В. Г., Ф. Е. А., К. Ю. С.), написание и редактирование манускрипта (А. В. Г., К. Ю. С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2024–2026 гг. 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 высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, протокол № 5 от 02.12.2020 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sarkisova KY, Midzianovskaia IS, Kulikov MA* (2003) Depressive-like behavioral alterations and c-fos expression in the dopaminergic brain regions in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Behav Brain Res* 144: 211–226.
[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00090-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00090-1)
2. *Sarkisova K, van Luijtelaaar G* (2011) The WAG/Rij strain: A genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 854–876.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010>
3. *Russo E, Citraro R, Constanti A, Leo A, Lüttjohann A, van Luijtelaaar G, De Sarro G* (2016) Upholding WAG/Rij rats as a model of absence epileptogenesis: Hidden mechanisms and a new theory on seizure development. *Neurosci Biobehav Rev* 71: 388–408.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.039>
4. *Tallarico M, Pisano M, Leo A, Russo E, Citraro R, De Sarro G* (2022) Antidepressant drugs for seizures and epilepsy: Where do we Stand? *Curr Neuropharmacol* 21: 1691–1713.
<https://doi.org/10.2174/1570159x20666220627160048>
5. *Gabova A V, Sarkisova KY* (2023) Maternal methyl enriched diet normalizes characteristics of the sleep –wake cycle and sleep spindles in adult offspring of WAG / Rij rats with genetic absence epilepsy. 59: 165–179.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023010143>
6. *van Luijtelaaar G, Bikbaev A* (2007) Midfrequency cortico-thalamic oscillations and the sleep cycle: Genetic, time of day and age effects. *Epilepsy Res* 73: 259–265.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.11.002>
7. *Wang Y-Q, Li R, Zhang M-Q, Zhang Z, Qu W-M, Huang Z-L* (2015) The Neurobiological Mechanisms and Treatments of REM Sleep Disturbances in Depression. *Curr Neuropharmacol* 13: 543–553.
<https://doi.org/10.2174/1570159x13666150310002540>
8. *Kovács Z, Czurkó A, Kékesi KA, Juhász G* (2012) Neonatal tricyclic antidepressant clomipramine treatment reduces the spike-wave discharge activity of the adult WAG/Rij rat. *Brain Res Bull* 89: 102–107.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.07.010>
9. *Ivarsson M, Paterson LM, Hutson PH* (2005) Antidepressants and REM sleep in Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats. *Eur J Pharmacol* 522: 63–71.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.08.050>
10. *Kansagra S* (2020) Sleep disorders in adolescents. *Pediatrics* 145.
<https://doi.org/10.1542/PEDS.2019-2056I>
11. *Omichi C, Kadotani H, Sumi Y, Ubara A, Nishikawa K, Matsuda A, Ozeki Y* (2022) Prolonged sleep latency and reduced REM latency are associated with depressive symptoms in a Japanese working population. *Int J Environ Res Public Health* 19.
<https://doi.org/10.3390/ijerph19042112>
12. *Lopes MC, Quera-Salva MA, Guilleminault C* (2007) Non-REM sleep instability in patients with major depressive disorder: Subjective improvement and improvement of non-REM sleep instability with treatment (Agomelatine). *Sleep Med* 9: 33–41.
<https://doi.org/10.1016/j.sleep.2007.01.011>
13. *Olbrich S, Arns M* (2013) EEG biomarkers in major depressive disorder: Discriminative power and prediction of treatment response. *Int Rev Psychiatry* 25: 604–618.
<https://doi.org/10.3109/09540261.2013.816269>
14. *Colavito V, Fabene PF, Grassi-Zucconi G, Pifferi F, Lamberty Y, Bentivoglio M, Bertini G* (2013) Experimental sleep deprivation as a tool to test memory deficits in rodents. *Front Syst Neurosci* 7: 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00106>

15. *Fogel SM, Smith CT* (2011) The function of the sleep spindle: A physiological index of intelligence and a mechanism for sleep-dependent memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 1154–1165. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.003>
16. *Al-Biltagi MA* (2014) Childhood epilepsy and sleep. *World J Clin Pediatr* 3: 45. <https://doi.org/10.5409/wjcp.v3.i3.45>
17. *Bloechliger M, Ceschi A, Rüegg S, Kupferschmidt H, Kraehenbuehl S, Jick SS, Meier CR, Bodmer M* (2016) Risk of seizures associated with antidepressant use in patients with depressive disorder: follow-up study with a nested case–control analysis using the clinical practice research datalink. *Drug Saf* 39: 307–321. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0363-z>
18. *Cotterman-Hart S* (2010) Depression in epilepsy: Why aren't we treating? *Epilepsy Behav* 19: 419–421. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2010.08.018>
19. *Oke A, Adhiyaman V, Aziz K, Ross A* (2001) Dose-dependent seizure activity associated with fluoxetine therapy [1]. *QJM – Mon J Assoc Physicians* 94: 113–114. <https://doi.org/10.1093/qjmed/94.2.113>
20. *Sarkisova KY, Gabova AV, Fedosova EA, Shatskova AB, Narkevich VB, Kudrin VS* (2023) Antidepressant and anxiolytic effects of L-methionine in the WAG/Rij rat model of depression comorbid with Absence Epilepsy. *Int J Mol Sci* 24. <https://doi.org/10.3390/ijms241512425>
21. *Fernandez LMJ, Lüthi A* (2020) Sleep spindles: Mechanisms and functions. *Physiol Rev* 100: 805–868. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2018>
22. *Kostopoulos GK* (2000) Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: The continuing development of a hypothesis. *Clin Neurophysiol* 111. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(00\)00399-0](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(00)00399-0)
23. *Kozák G, Földi T, Berényi A* (2020) Spike-and-wave discharges are not pathological sleep spindles, network-level aspects of age-dependent absence seizure development in rats. *eNeuro* 7(1): ENEURO. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0253-19.2019>
24. *Born J, Rasch B, Gais S* (2006) Sleep to remember. *Neuroscientist* 12: 410–424. <https://doi.org/10.1177/1073858406292647>
25. *Marshall L, Born J* (2007) The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends Cogn Sci* 11: 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2007.09.001>
26. *Sitnikova E, Hramov AE, Grubov V, Koronovsky AA* (2014) Time-frequency characteristics and dynamics of sleep spindles in WAG/Rij rats with absence epilepsy. *Brain Res* 1543: 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.11.001>
27. *Puścian A, Winiarski M, Łęski S, Charzewski Ł, Nikolaev T, Borowska J, Dzik JM, Bijata M, Lipp HP, Dziembowska M, Knapka E* (2021) Chronic fluoxetine treatment impairs motivation and reward learning by affecting neuronal plasticity in the central amygdala. *Br J Pharmacol* 178: 672–688. <https://doi.org/10.1111/bph.15319>
28. *Olguner Eker Ö, Özsoy Ş, Eker B, Doğan H* (2017) Metabolic effects of antidepressant treatment. *Noropsikiyatri Ars* 54: 49–56.
29. *Dorsey CM, Lukas SE, Cunningham SL* (1996) Fluoxetine-induced sleep disturbance in depressed patients. *Neuropsychopharmacology* 14: 437–442. [https://doi.org/10.1016/0893-133X\(95\)00148-7](https://doi.org/10.1016/0893-133X(95)00148-7)
30. *Valvassori SS, Cararo JH, Marino CAP, Possamai-Della T, Ferreira CL, Aguiar-Geraldo JM, Dal-Pont GC, Quevedo J* (2022) Imipramine induces hyperactivity in rats pretreated with ouabain: Implications to the mania switch induced by antidepressants. *J Affect Disord* 299: 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.12.021>
31. *Geoffroy M, Scheel-Krüger J, Christensen AV* (1990) Effect of imipramine in the “learned helplessness” model of depression in rats is not mimicked by combinations of specific reuptake inhibitors and scopolamine. *Psychopharmacology (Berl)* 101: 371–375. <https://doi.org/10.1007/BF02244056>
32. *Sarkisova KY, Kulikov MA, Midzyanovskaya IS, Folomkina AA* (2008) Dopamine-dependent nature of depression-like behavior in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 38: 119–128. <https://doi.org/10.1007/s11055-008-0017-z>
33. *Gervasoni D, Panconi E, Henninot V, Boissard R, Barbagli B, Fort P, Luppi PH* (2002) Effect of chronic treatment with miltacipran on sleep architecture in rats compared with paroxetine and imipramine. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 557–563. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00812-2](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00812-2)

34. *Wichniak A, Wierzbicka A, Wałęcka M, Jernajczyk W* (2017) Effects of Antidepressants on Sleep. *Curr Psychiatry Rep* 19: 1–7.
<https://doi.org/10.1007/s11920-017-0816-4>
35. *Sarkisova KY, Fedosova EA, Shatskova AB, Rudenok MM, Stanishevskaya VA, Slominsky PA* (2023). Maternal methyl-enriched diet increases DNMT1, NCN1, and TH gene expression and suppresses absence seizures and comorbid depression in offspring of WAG/Rij rats. *Diagnostics* 13(3): 398.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13030398>
36. *Sarkisova KY, Kulikov MA* (2006) Behavioral characteristics of WAG/Rij rats susceptible and non-susceptible to audiogenic seizures. *Behav Brain Res* 166: 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.07.024>
37. *Sarkisova KY, Gabova AV* (2018) Maternal care exerts disease-modifying effects on genetic absence epilepsy and comorbid depression. *Genes Brain Behav* 17: e12477.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12477>
38. *Sarkisova KY, Gabova AV, Kulikov MA, Fedosova EA, Shatskova AB, Morosov AA* (2017) Rearing by foster Wistar mother with high level of maternal care counteracts the development of genetic absence epilepsy and comorbid depression in WAG/Rij rats. *Dokl Biol Sci* 473: 39–42.
<https://doi.org/10.1134/S0012496617020077>
39. *Wichniak A, Wierzbicka A, Jernajczyk W* (2012) Sleep and Antidepressant Treatment. *Curr Pharm Des* 18 (36): 5802–5817.
<https://doi.org/10.2174/138161212803523608>
40. *Armitage R* (2000) The effect of antidepressants on sleep in patients with depression. *Can J Psychiatry* 45 (9): 803–809.
<https://doi.org/10.1177/070674370004500903>
41. *Duncan D, Taylor D* (1995) Which is the safest antidepressant to use in epilepsy? *Psychiatr Bull* 19: 355–357.
<https://doi.org/10.1192/pb.19.6.355>
42. *Citraro R, Leo A, De Fazio P, De Sarro G, Russo E* (2015) Antidepressants but not antipsychotics have antiepileptogenic effects with limited effects on comorbid depressive-like behaviour in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Br J Pharmacol* 172: 3177–3188.
<https://doi.org/10.1111/bph.13121>
43. *Hutka P, Krivosova M, Muchova Z, Tonhajzerova I, Hamrakova A, Mlynckova Z, Mokry J, Ondrejka I* (2021) Association of sleep architecture and physiology with depressive disorder and antidepressants treatment. *Int J Mol Sci* 22: 1333.
<https://doi.org/10.3390/ijms22031333>
44. *Roeber J, Lewis P, Crunelli V, Navarette M, Hamandi K* (2022) Effect of anti-seizure medication on sleep spindles and slow waves in drug resistant epilepsy. *Brain Sci* 12: 1288.
<https://doi.org/10.3390/brainsci12101288>
45. *Nishida M, Nakashima Y, Nishikawa T* (2014) Topographical Distribution of fast and slow sleep spindles in medicated depressive patients. *J Clin Neurophysiol* 31: 402–408.
<https://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000068>
46. *Bovy L, Weber F, Tendolkar I, Fernandez G, Czisch M, Steiger A, Zeising M, Dresler M* (2022) Non-REM sleep in major depressive disorder. *Neuroimage Clin* 36: 103275.
<https://doi.org/10.1016/j.nicl.2022.103275>
47. *Steiger A, Pawlowski M, Kimura M* (2015) Sleep electroencephalography as a biomarker in depression. *Chronophysiol and Therapy* 5: 15–25.
<https://doi.org/10.2147/CPT/S41760>

Spindles in WAG/Rij Rats with Absence Epilepsy and Comorbid Depression

A. V. Gabova^a, E. A. Fedosova^a, and K. Yu. Sarkisova^a

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

**e-mail: agabova@yandex.ru*

WAG/Rij rats are a valid model of absence epilepsy and comorbid depression. We have previously shown that WAG/Rij rats have disturbances in the sleep-wake cycle and changes in the characteristics of sleep spindles. A negative correlation was also found between the number of spike-wave discharges (SWD) and the duration of rapid eye movement (REM) sleep. Clinical evidence suggests that the traditional antidepressants imipramine and fluoxetine are effective in suppressing symptoms of depression, but may have a negative impact on the sleep-wake cycle and comorbid epilepsy in patients. Our previous studies in WAG/Rij rats showed that imipramine, when administered chronically, increases the number of SWDs, while fluoxetine at the same dose reduces their number, although both antidepressants have a pronounced antidepressant effect. Comparison of the effects of the antidepressants imipramine and fluoxetine on the sleep-wake cycle and sleep spindles in WAG/Rij rats remains unstudied. The purpose of this work is to find out: 1) what effects do imipramine and fluoxetine have on the sleep-wake cycle and the characteristics of sleep spindles in WAG/Rij rats and 2) whether there are differences in their effects. To achieve this goal, the characteristics of the sleep-wake cycle and sleep spindles were compared in WAG/Rij rats after chronic administration of antidepressants and saline and in non-epileptic Wistar rats. Administration of imipramine led to a significant decrease in the duration of REM sleep. The administration of imipramine, compared with fluoxetine, also increased the latency of the transition to sleep and the transition to REM sleep. Sleep spindle amplitude was significantly increased by both antidepressants. However, the spectral power density of “slow” and “medium” spindles, which predominate in WAG/Rij rats compared to Wistar rats, was significantly higher after administration of imipramine than fluoxetine. The results suggest that imipramine causes greater negative changes in the sleep-wake cycle and sleep spindles than fluoxetine. Studies in the WAG/Rij rat model indicate that fluoxetine is more preferable antidepressant for the treatment of depressive disorders comorbid with absence epilepsy, since it does not cause a significant deterioration in sleep quality. These results are consistent with clinical data.

Keywords: antidepressant, fluoxetine, imipramine, absence epilepsy, genetic model, comorbid depression, WAG/Rij rat, sleep-wake cycle, slow wave sleep, REM sleep, sleep spindle