

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 110 № 7

ИЮЛЬ
2024



НАУКА

— 1727 —



СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Молекулярно-генетические маркеры нейроглии при черепно-мозговых травмах и их использование для оценки функционального состояния спортсменов

А. В. Черепанова, Я. Р. Бравый, А. В. Карабельский, М. М. Котова, А. С. Щербакова, К. В. Апухтин, В. С. Никитин, М. Ю. Бобров, А. В. Калугев 1057

Гонадотропин-рилизинг-гормон и органы иммунной системы

И. В. Майбородин, И. О. Маринкин, Н. В. Оноприенко, В. И. Майбородина 1075

Особенности функционирования клеток мозга при гипергликемии и сахарном диабете

М. П. Морозова, И. Г. Савинкова, Л. Р. Горбачева 1090

Повышенный уровень кортизола и антиглюкокортикоидная терапия при аффективных расстройствах: гиппокамп как потенциальная мишень

Н. В. Гуляева 1108

Экспериментальные статьи

Нарушения содержания железа и цинка в тканях у мышей при росте гепатомы 22a и их коррекция с помощью сульфата цинка

Е. А. Зеленский, К. В. Рутто, А. С. Трулев, Д. Н. Магазенкова, А. В. Соколов, Е. П. Киселева 1128

Анализ корреляций между параметрами поведения в приподнятом крестообразном лабиринте и уровнем интерлейкина-1β в плазме крови у крыс

Н. П. Комышева, Г. Т. Шишкина, А. И. Мухамадеева, Н. Н. Дыгало 1147

Формирование условного рефлекса активного избегания у крыс с разным уровнем предрасположенности к аудиогенной эпилепсии

Н. М. Сурина, С. Н. Кондратова, Г. М. Николаев, И. Б. Федотова, И. И. Полетаева 1158

О связи гемореологических показателей крови и скорости кровотока в сосудах микроциркуляторного русла кожи у крыс

Н. Н. Петрицев, М. А. Скедина, Т. Г. Гришачева, С. Г. Чефу, А. А. Ковалева, А. М. Носовский 1167

Объединение методов однофотонной миниатюрной флуоресцентной микроскопии и электрофизиологической регистрации для исследования активности нейронов гиппокампа *in vivo*

А. И. Ерофеев, Е. К. Винокуров, И. Е. Антифеев, О. Л. Власова, И. Б. Безпрозванный, 1180

Нарушения волны N170 слуховых вызванных потенциалов как результат патологии процесса элиминации синапсов у больных параноидной шизофренией с первым психотическим приступом

А. Ю. Архипов, Г. И. Родионов, В. Б. Стрелец 1207

CONTENTS

Reviews

Molecular-Genetic Markers of Neuroglia in Traumatic Brain Injury and their Use for Assessing Functional Status of Sportsmen	
<i>A. V. Cherepanova, Y. R. Bravy, A.V. Karabelsky, and M. M. Kotova</i>	1057
Gonadotropin-Releasing Hormone and Organs of the Immune System	
<i>I. V. Maiborodin, I. O. Marinkin, N. V. Onoprienko, and V. I. Maiborodina</i>	1075
Peculiarities of Brain Cell Functioning During Hyperglycemia and Diabetes Mellitus	
<i>M. P. Morozova, I. G. Savinkova, and L. R. Gorbacheva</i>	1090
Augmented Cortisol and Antigluco corticoid Therapy in Mood Disorders: the Hippocampus as a Potential Drug Target	
<i>N. V. Gulyaeva</i>	1108

Experimental articles

Alterations in Tissue Content of Iron and Zinc in Mice Bearing Hepatoma 22a and their Correction by Zinc Sulphate Supplementation	
<i>E. A. Zelenskyi, K. V. Rutto, A. S. Trulioff, D. N. Magazenkova, A. V. Sokolova, and E. P. Kisseleva</i>	1128
Analysis of Correlations Between Behavioral Parameters in the Elevated Plus Maze and the Levels of Interleukin-1beta in Blood Plasma in Rats	
<i>N. P. Komysheva, G. T. Shishkina, A. I. Mukhamadeeva, and N. N. Dygalo</i>	1147
Active Avoidance Learning in Rats with Different Audiogenic Epilepsy Proneness	
<i>N. M. Surina, S. N. Kondratova, G. M. Nikolaev, I. B. Fedotova, and I. I. Poletaeva</i>	1158
The Relationship of Hemorheological Blood Values and Blood Velocity of Microcirculatory Bloodstream in Rats' Skin Vessels	
<i>N. N. Petrishchev, M. A. Skedina, T. G. Grishacheva, S. G. Chefu, A. A. Kovaleva, and A. M. Nosovskij</i>	1167
Integration of Single-Photon Miniature Fluorescence Microscopy and Electrophysiological Recording Methods for <i>in Vivo</i> Studying Hippocampal Neuronal Activity	
<i>A. I. Erofeev, E. K. Vinokurov, I. E. Antifeev, O. L. Vlasova, and I.B. Bezprozvanny</i>	1180
Disturbances of the Process of Synaptic Elimination and Its Reflection in the Wave N170 of Auditory Evoked Potential (AEP) in First Psychotic Episode of Paranoid Schizophrenia	
<i>A. Yu. Arkhipov, G. I. Rodionov, and V. B. Strelets</i>	1207

ОБЗОРЫ

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕЙРОГЛИИ
ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВЫХ ТРАВМАХ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СПОРТСМЕНОВ**

© 2024 г. А. В. Черепанова^{1,*}, Я. Р. Бравый¹, А. В. Карабельский¹, М. М. Котова¹,
А. С. Щербакова², К. В. Апухтин¹, В. С. Никитин¹, М. Ю. Бобров¹, А. В. Калуев^{1,3}

¹Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно–
технологический университет «Сириус», пгт. Сириус, Россия

²Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Краснодар, Россия

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

*E-mail: anesthesia.cher@gmail.com

Поступила в редакцию 20.01.2024 г.

После доработки 05.05.2024 г.

Принята к публикации 30.05.2024 г.

Нейроглия выполняет многие важные физиологические функции, включая поддержание гомеостаза и метаболизма клеток мозга, нейропротекцию и модуляцию нейротрансмиссии. Изучение роли нейроглии необходимо для понимания развития патологических нейродегенеративных процессов, а также восстановления нервной ткани при нейровоспалении или травмах мозга, часто отмечающихся в спорте. Однако анализ процессов, происходящих в нейроглиальных клетках, затруднен из-за их высокой гетерогенности и отсутствия системы биомаркеров, позволяющих однозначно оценить функциональное состояние нервной системы в целом. В работе анализируются данные о клинически и биологически значимых молекулярно-генетических маркерах разных типов нейроглии и обсуждаются перспективы их использования в спорте, в том числе для оценки состояния спортсменов на фоне травм мозга различной тяжести и иных видов спортивных травм.

Ключевые слова: астроглия, олигодендроциты, микроглия, маркеры нейроглии, физиология спорта

DOI: 10.31857/S0869813924070015, **EDN:** BEDMRQ

ВВЕДЕНИЕ

РОЛЬ НЕЙРОГЛИИ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Помимо нейронов, центральная нервная система (ЦНС) содержит глию (нейроглию) – гетерогенную группу клеток, выполняющую важные функции поддержания гомеостаза мозга [1]. Нейроглия включает в себя радиальную глию, астроциты, олигодендроциты и их предшественники, а также микроглию и составляет около половины

всех клеток мозга [1]. Доля глиальных и нейрональных клеток варьирует в зависимости от региона мозга. В среднем у человека количество нейронов и общее количество клеток глии приблизительно равны. Из них порядка 20% приходится на долю астроцитов, 25% олигодендроцитов и 5–15% микроглии [1]. Глиальные клетки являются важной частью нормального функционирования ЦНС [2], включая регуляцию ионов и нейротрансмиттеров, метаболизм нейронов, синапто- и нейрогенез, синаптическую коммуникацию, нейроиммуномодуляцию и поддержание гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [1]. Дисфункции нейроглии играют важную роль в патогенезе различных нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезней Альцгеймера и Паркинсона, деменции, энцефалопатий и других [3]. Поэтому изучение функциональных изменений ЦНС невозможно без понимания участия нейроглии и выполняемых ею функций.

Астроциты – гетерогенная группа клеток, взаимодействующих с нейронами, другими глиальными клетками и кровеносными сосудами [3, 4]. Многочисленные отростки астроцитов обеспечивают высокую площадь контакта с кровеносными сосудами и клетками нервной системы [4]. Для астроцитов характерны разнообразие морфологии и выполняемых функций и неравномерная представленность в различных областях мозга. Астроциты играют важную роль в модуляции нейронной активности и синаптической передачи, синаптогенезе, контроле концентрации ионов, нейромедиаторов и нейрогормонов, а также отвечают за снабжение нейронов глутамином – предшественником глутамата и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [5, 6]. В функции астроцитов входят контроль гомеостаза калия за счет пространственной буферизации или активного поглощения натрий-калиевой АТФазой, удаление избыточного глутамата, питание нейронов и контроль стабильности синапсов [2, 6]. Кроме того, астроциты сами способны выделять нейромедиаторы, например, глутамат, ГАМК, D-серин, таурины и кинуреновую кислоту [2]. Традиционно астроциты разделяют на два основных фенотипа: нейротоксический А1 и нейропротекторный А2, которые синтезируют про- или противовоспалительные факторы соответственно [7]. Гетерогенность астроцитов подтверждается как морфологическими отличиями (по длине и разветвленности клеточных отростков), так и специфическими экспрессируемыми маркерами (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Биомаркеры нейроглии, связанные с патологическими состояниями ЦНС

Биомаркер	Тип нейроглии	Характеристика
GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок)	Астроциты	Один из основных маркеров астроцитов. Повышенный уровень GFAP связан с активацией астроцитов в ответ на травму или другие патологические состояния, такие как астроглиоз (пролиферация астроцитов при повреждении ЦНС) или нейровоспаление
S100 β (кальций-связывающий белок S100)	Астроциты	Может повышаться при различных патологических состояниях, включая ЧМТ, воспаление или нейродегенеративные заболевания
VEGF-A (фактор роста эндотелия сосудов A)	Астроциты	Сигнальный белок, вырабатывающийся для ангиогенной стимуляции, сверхэкспрессия которого способствует развитию неврологических заболеваний

Продолжение Таблицы 1.

Биомаркер	Тип нейроглии	Характеристика
Тау-белок	Астроциты	Нейрональный белок, играющий важную роль в стабилизации аксонов, развитии и поляризации нейронов. Повышен при нейродегенеративных заболеваниях (болезней Альцгеймера и Паркинсона, деменции)
ET-1 (эндотелин-1)	Астроциты	Вызывает повреждение ЦНС за счет сужения церебральных артериол (нарушения церебральной микроциркуляции), увеличения проницаемости ГЭБ, воспаления, нарушения аксонального транспорта, астроглиоза)
ALDH1L1 (Альдегиддегидрогеназа 1L1)	Астроциты	Сверхэкспрессируется в реактивных астроцитах как при остром повреждении ЦНС, так и при хронических нейродегенеративных состояниях (аналогично GFAP)
AQP4 (аквапорины 4-го типа)	Астроциты	Играют важную роль в регуляции водного баланса и транспорте воды через мембраны астроцитов. Изменения в их экспрессии связывают с различными патологиями, такими как отеки головного мозга
NG2-протеогликан	Олигодендроциты	Присутствует в миелиновой оболочке и является одним из основных маркеров олигодендроцитов, участвуя в формировании и стабилизации миелина (изменения в его экспрессии отражают процессы миелинизации или демиелинизации)
Olig2 (транскрипционный фактор олигодендроцитов 2)	Олигодендроциты	Специфичен для олигодендроцитов и играет ключевую роль в их формировании и дифференциации, а также в образовании и восстановлении миелина
CCL2 (хемокин-лиганд мотива CC)	Микроглия	Измененная экспрессия CCL2 или его рецептора CCR2 играет важную роль в распространении патологии путем привлечения периферических и центральных иммунных клеток в область повреждения и инициирует воспалительную реакцию
CLR (лектиновые рецепторы C-типа)	Микроглия	Повышенная экспрессия наблюдается при активации макрофагов и повреждении аксонов

Окончание Таблицы 1.

Биомаркер	Тип нейроглии	Характеристика
TNF- α (фактор некроза опухоли), IL-1 β , IL-16 (провоспалительные интерлейкины)	Микроглия	Маркер нейровоспаления, выработки цитокинов, пролиферации клеток, апоптоза и противодействия инфекциям ЦНС
IL-4, IL-10, IL-13 и TGF- β (нейропротекторные интерлейкины)	Микроглия	Ингибиторы провоспалительных цитокинов и нейротоксических реакций
iNOS (индуцибельная синтаза азота NO)	Микроглия	Способствует притоку иммунных клеток из периферии в очаг поражения
CD11b	Микроглия	Маркер активированной микроглии в различных состояниях, включая воспалительные реакции и травмы
CD68	Микроглия	Маркер фагоцитоза и лизосомальной активности микроглии при очистке тканей от микроорганизмов или мертвых клеток
HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – DR isotype)	Микроглия	Ассоциируется с активированными клетками иммунной системы, включая микроглию, в состоянии воспаления или при иммунном ответе

В частности, выделяют две группы астроцитов: протоплазматические и фиброзные [4, 6]. Для первых характерно наличие длинных неразветвленных отростков и преимущественная экспрессия маркера из группы кальций-связывающих белков S100 β , в то время как для вторых – сильно разветвленные короткие отростки и экспрессия глиального фибриллярного белка (GFAP) [6]. Изменения экспрессии GFAP и особенности морфологии астроцитов коррелируют с тяжестью реактивного астроглиоза, что указывает на наличие патологий ЦНС [8]. Астроциты демонстрируют структурную пластичность в ответ на активность нейронов, в свою очередь способствуя ремоделированию окружающих синапсов, что крайне важно для обучения и памяти [4]. Астроциты также участвуют в синтезе различных малых молекул, среди которых клиническими значимыми считаются GFAP [9], S100 β [10], VEGF-A (фактор роста эндотелия сосудов A) [9, 11], тау-белок [12], ET-1 (эндотелин-1) [13], ALDH1L1 (альдегиддегидрогеназа 1L1) [14], AQP4 (аквапорины 4-го типа) [11, 15] и другие.

Биомаркеры, которые отражают функциональный статус астроцитов, можно использовать для выявления повреждений и нейропатологических воспалительных процессов в ЦНС. Изменения морфологии астроцитов характерны для многих заболеваний ЦНС (рассеянного склероза, болезней Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона и многочисленных нейродегенеративных расстройств [16]) и могут быть связаны с изменениями реакции на стресс, а также проявлением депрессивно-подобного поведения и когнитивных нарушений, как показано на животных моделях [17].

Олигодендроциты появляются в ЦНС из клеток-предшественников олигодендроцитов, которые пролиферируют и дифференцируются в зрелые олигодендроциты на протяжении всей жизни [18, 19]. Олигодендроциты и клетки-предшественники объе-

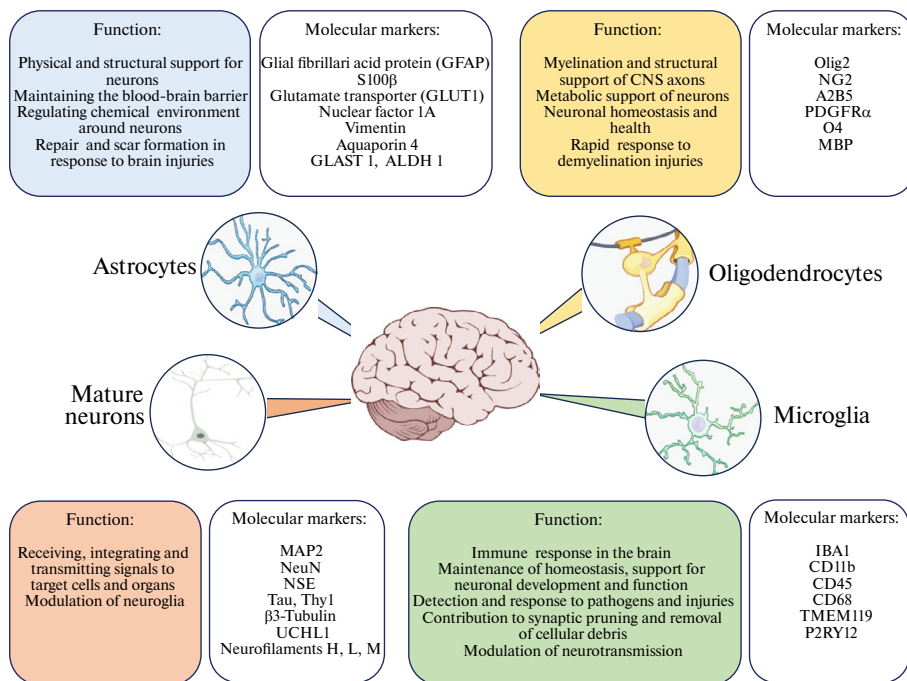


Рис. 1. Физиологическая роль и молекулярные маркеры нейронов и клеток глии (см. также табл. 1).

диняют в клеточную линию олигодендроцитов, основными маркерами экспрессии которых являются NG2-протеогликан (CSPG4), экспрессируемый на поверхности клеток, и транскрипционный фактор олигодендроцитов Olig2 [19]. Олигодендроциты образуют миелиновую многослойную оболочку, необходимую для проводимости нервного сигнала по аксонам, а также обеспечивают последующее ремоделирование миелина, что модулирует активность нейронов, в частности, при обучении сложным двигательным навыкам [20]. Помимо миелинизации нервных волокон, олигодендроциты важны для метаболической поддержки нейронов, обеспечивая передачу метаболитов (пирувата и лактата) через цитоплазматические каналы и монокарбоксилатные транспортеры [21]. Олигодендроциты являются мишенью при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, в частности, рассеянном склерозе, шизофрении или болезни Альцгеймера [18]. При рассеянном склерозе – серьезном хроническом невровоспалительном заболевании – тяжесть повреждения олигодендроцитов и демиелинизации коррелирует с клиническим прогрессированием расстройства [20], также приводя к нарушению когнитивных функций, координации и сенсорного восприятия [21]. Повреждения олигодендроцитов и миелиновой оболочки представляет собой обратимый процесс, при котором может быть предотвращена дегенерация аксонов и сохранение когнитивных функций [18].

Микроглия представляет собой резидентные мононуклеарные фагоциты, мигрирующие в ЦНС во время эмбриогенеза. В отличие от нейронов и других клеток нейроглии, микроглия имеет не нейроэктодермальное, а гематопозитическое происхождение [22]. Микроглия выполняет важные воспалительные и иммунорегуляторные функции, в т. ч. детекцию очагов повреждения, миграцию к ним, выделение цитокинов, фагоци-

тоз, а также ремоделирование синапсов, поддержание гомеостаза и синтез нейротрофических факторов [2, 23, 24]. Кроме того, микроглия, высвобождая активные формы кислорода или воспалительные цитокины, вызывает цитотоксическое повреждение нейронов [25]. Активация микроглии происходит в ответ на инфекции, травмы ЦНС, нейродегенеративные заболевания, изменения функционального состояния нейронов и нарушения гомеостаза мозга, приводя к нейровоспалению.

Морфологические изменения микроглии при взаимодействии с другими клетками динамичны и гетерогенны, осложняя понимание физиологии микроглии относительно ее морфологии [22]. Традиционно микроглию, как и астроциты, разделяют на два основных фенотипа: нейротоксический M1 и нейропротекторный M2, которые синтезируют про- либо противовоспалительные медиаторы соответственно [26]. Дихотомическая классификация, однако, не отражает всей динамики потери и приобретения нейропротекторных и нейротоксических функций, определяя спектр функций, а не две отдельные популяции [26]. Надежным маркером функционального состояния микроглии является уровень экспрессии определенных генов. Биомаркеры необходимы как для определения степени нейровоспаления, так и для исследования механизмов его модуляции [26]. Например, в ответ на повреждение нервной ткани микроглия синтезирует провоспалительные цитокины TNF- α (фактор некроза опухоли), интерлейкины IL-1 β , IL-16, хемокины CCL2 IL-18, и NO (оксид азота) [27]. К нейропротекторным биомаркерам микроглии относятся интерлейкины IL-4, IL-10, IL-13 и TGF- β (трансформирующий фактор роста) [28]. Клеточный ответ микроглии различен при получении травм (черепно-мозговой травмы (ЧМТ) или травмы спинного мозга) и при развитии нейродегенеративных заболеваний [29]. При развитии ЧМТ наблюдается переход микроглии в CD68-иммунореактивное состояние, увеличивается плотность клеток CD68, а также наблюдается повышение уровня цитокина CCL11. CCL11 является отличительным маркером ЧМТ, количество которого не повышается, в частности, при болезни Альцгеймера [30].

Несмотря на важность клеток микроглии для поддержания гомеостаза ЦНС, понимание молекулярных процессов, происходящих при тех или иных физиологических состояниях организма, остается плохо изученным. В частности, неясны роль, поведение и изменение молекулярного профиля микроглиальных клеток в ответ на различные патологические состояния или повреждения нервной системы. Отсутствие надежной тест-системы, с помощью которой можно однозначно определить патологические процессы нервной ткани при получении травмы, а также следить за динамикой во время восстановления также является актуальной проблемой нейробиологии и медицины. Цель настоящего обзора – анализ данных об известных молекулярных маркерах, отражающих функциональный статус различных типов микроглии, которые возможно использовать в качестве тест-системы, в частности, в контексте спорта по причине высокой травмоопасности данного вида деятельности для человека, и вместе с тем – на фоне недостаточной изученности данного направления спортивной медицины.

НЕЙРОГЛИЯ И ТРАВМЫ В СПОРТЕ

Одной из самых распространенных проблем в спорте является получение травм, особенно ЧМТ [31]. К прямым последствиям ЧМТ относят тяжелые повреждения тканей головного мозга, внутричерепное кровоизлияние, субдуральную и эпидуральную гематомы (которые могут привести к летальному исходу), а также функциональные повреждения и нарушения аксонов. Среди морфологических последствий ЧМТ выделяют повреждения тканей мозга (атрофия, образование рубцов и спаек) и тканей скелета (остеосклероз), ликвородинамические последствия (дисциркуляция, дизрезорбция, ликворея, ликворома) и сосудистые нарушения (дисциркуляция, ишемия, тромбоз и др.) [32]. Симптоматика более легких ЧМТ, как правило, проходит в течение

нескольких недель, однако приобретенные в их результате аксонопатии могут сохраняться многие годы [25, 33]. Последствия даже легких ЧМТ включают неврологические и двигательные нарушения, хроническую травматическую энцефалопатию (ХТЭ) [34, 35], а также предрасположенность к развитию возрастных нейродегенеративных заболеваний [36] – болезней Альцгеймера и Паркинсона и, возможно, спорадического бокового амиотрофического склероза [37]. Важными факторами риска патогенеза заболеваний ЦНС являются возраст, генетические маркеры (к примеру, наличие одного или двух аллелей гена *APOE4*, продукт которого отвечает за транспорт липидов), [37, 38]. Симптомы ЧМТ умеренной или тяжелой степени могут включать в себя потерю сознания, головные боли, тошноту, судороги, расширение зрачков, потерю координации, спутанность сознания, нетипичное поведение, проблемы с речью и другие когнитивные расстройства [35, 39].

Патогенез ЧМТ характеризуется множеством факторов, для которых глия играет важную роль [40]. Раннее выявление ЧМТ в спорте имеет первостепенное значение для предупреждения ухудшения неврологического и психического состояния, а также для быстрого восстановления спортсменов и их возвращения к тренировкам и участию в соревнованиях. Другой важной задачей успешного восстановления спортсмена является недопущение преждевременного возвращения к спортивной деятельности после ЧМТ, что также может увеличить риски неврологических патологий [41]. Поэтому поиск и изучение маркеров, по которым можно установить наличие нейродегенеративной патологии и достоверно оценить состояние спортсменов, является крайне важной задачей как для области спорта, так и здравоохранения в целом.

К видам спорта, связанных с повышенным риском получения травмы головы, относятся в первую очередь контактные виды спорта, такие как футбол, хоккей, регби, боевые искусства и бокс [34, 42, 43]. Например, смерть от ЧМТ и развития субдуральной гематомы особенно часто среди боксеров [25]. В свою очередь, снижение смертности может быть связано с более короткой карьерой спортсменов и соответственно меньшим количеством тяжелых и меньшей продолжительностью легких повторяющихся ЧМТ [25, 44]. Получение ЧМТ в спорте отрицательно сказывается на качестве жизни спортсменов после окончания карьеры. Например, высокий процент ХТЭ отмечается среди бывших спортсменов, например, футболистов национальной футбольной лиги [37].

В настоящее время перспективными биомаркерами ЧМТ считают тау-белок, NFL (легкие нейрофиламенты) [45], SNTF (N-концевой фрагмент α II-спектрина) [46], NSE (нейрон-специфическая енолаза) [45], S100B (специфичный астроцитарный белок) [44], UCH-L1 (убиквитин C-концевая гидролаза L1) и GFAP [47]. Изменения тау-белка, NFL, SNTF, GFAP коррелируют с тяжестью сотрясения мозга [41], достигая пика чаще всего через 3 месяца после ЧМТ [48]. На этом фоне также отмечается повышение титра антител к белкам, связанных со специфическими белками нейроглии и сосудов, что может указывать на изменения сосудов и усиление аутоиммунного воспаления [48].

Активация микроглии и астроцитов может явиться связующим звеном между получением ЧМТ и развитием ХТЭ [25, 42], которая сопровождается диффузной атрофией мозга, увеличением размеров желудочков, глиозом, дисфункцией мозжечка и дегенерацией компактной части черной субстанции [34, 49]. Вторичный патогенез включает в себя поражение сосудов ЦНС, гипоксию, ишемию, нарушения функций митохондрий, гипометаболизм и отек головного мозга [37]. И если на ранней стадии симптоматика практически отсутствует, то по мере развития ХТЭ появляются головная боль, нарушение внимания, дефицит кратковременной памяти, агрессивное поведение, перепады настроения, паранойя, суициальные наклонности, а также деменция [37].

Характерными симптомами прогрессирующей ХТЭ являются неустойчивость, замедленная мышечная реакция, спутанность сознания, нерешительная речь, тремор [34]. У спортсменов различных видов спорта (футбол, хоккей, борьба и бокс), разви-

тие ХТЭ сопровождается ухудшением когнитивных функций (памяти) и изменениями в поведении (проявлениями импульсивности, вспыльчивости, склонности к насилию) и настроению (депрессивность) [49]. При этом в группе спортсменов с первичными когнитивными отклонениями реже встречаются изменения поведения, и наоборот [49].

Подверженность хроническим травмам головы имеет собственные гистопатологические проявления, которые отличаются при получении единичных тяжелых ЧМТ [34] – появление нейрофибрилярных клубков тау-белка, что может быть причиной последующего появления поведенческих и нейромоторных патологий [42]. Наличие гиперфосфорилированного тау-белка является специфическим гистологическим признаком ХТЭ [35, 50], образуя агрегаты из тауолигомеров и препятствуя нормальному функционированию аксонов [42].

Важным инструментом клинической диагностики является измерение специфических биомаркеров, экспрессия которых изменяется при получении сотрясения мозга или других ЧМТ. Несмотря на то, что оценка биомаркеров по анализу крови часто осложнена из-за быстрой деградации и выведения их из организма, описано повышение содержания тау-белка и S100 у профессиональных хоккеистов [25].

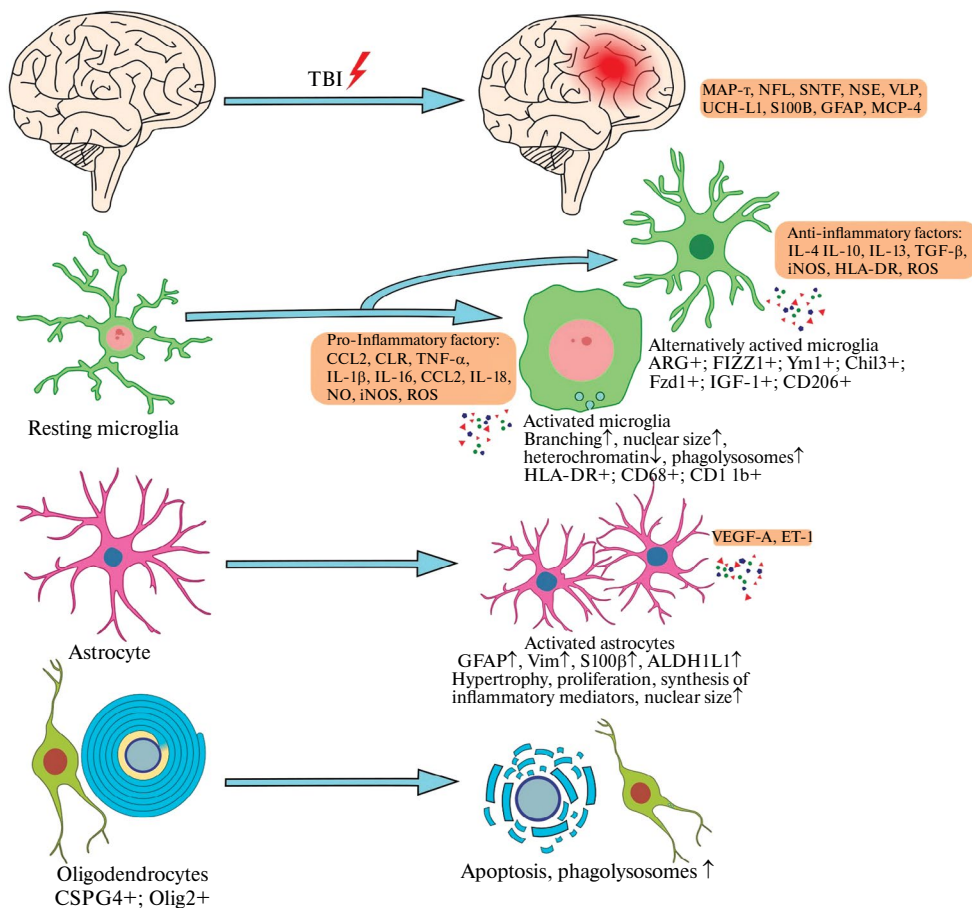


Рис. 2. Изменение функциональной активности глиальных клеток при черепно-мозговой травме.

Также к потенциальным маркерам относятся S100 β (преимущественно экспрессируемый в нейроглии), GFAP, NSE (нейронспецифическая энолаза), тау-белок, NFL (нейрофиламентные белки), бета-амилоид, BDNF (нейротрофический фактор мозга), hFABP (белок, связывающий жирные кислоты), пролактин и альбумин, по данным, полученным на спортсменах, занимающихся боксом, футболом, хоккеем, баскетболом, а также на выборке контрольной группы пациентов с ЧМТ [37].

Повышение функциональной активности астроцитов описано в клинике и на экспериментальных животных моделях ЧМТ [40]. Основным механизмом активации астроцитов является опосредованное микроглией взаимодействие через провоспалительные цитокины [42]. Изменения в функциональном ответе астроцитов приводят как к положительным (нейро- и синаптогенез), так и к вредным (нейровоспаление, отек головного мозга, нарушение ГЭБ, повреждение синапсов) последствиям при ЧМТ [40, 51]. Характерными чертами функционально активных астроцитов являются гипертрофия клеток, повышенная пролиферация, активный синтез медиаторов воспаления, нейротрофических факторов и промежуточных филаментов (GFAP и виментина). Другой маркер повышенной активности астроцитов – нейротрофин S100, повышается в спинномозговой жидкости и способствует нейрогенезу и восстановлению когнитивных функций ЦНС после ЧМТ за счет усиления дифференцировки и пролиферации нейронов [40].

Важный белок синаптогенеза – эфрин-B1, представляющий собой фактор, который регулирует развитие синапсов нейронов. Эфрин-B1 влияет на гиппокамп-зависимую контекстуальную память у человека [40]. Кроме того, было показано, что нарушения в сигналинге эфрина-B1 (при его генетическом нокауте) связаны с ухудшением контекстуальной памяти у мышей [52]. Астроцитарный фактор роста эндотелия сосудов A (VEGF-A) регулирует проницаемость ГЭБ и также сверхэкспрессируется в модели ЧМТ у мышей [53, 54]. Эндотелин-1 (ET-1), синтезируемый астроцитами, препятствует ослаблению ГЭБ, в то время как его селективные ингибиторы (бозетан и BQ788) нарушают функции ET-1 и ГЭБ [40].

Олигодендроциты также играют важную роль в восстановлении белого вещества, миелинизации и последующей реабилитации после ЧМТ. Тяжесть поражения белого вещества зависит от степени и распространения повреждений, полученных при ЧМТ – микрокровоизлияний и нейровоспаления, приводящих к потере аксонов и миелинизированных волокон, а также олигодендроцитов (в результате апоптоза). Повреждение миелина приводит к большей уязвимости демиелинированных аксонов и восприимчивости к новым повреждениям и хронической нейродегенерации при ЧМТ, однако с возможностью повторной ремиелинизации и восстановления функций [55].

Отмечена взаимосвязь между возникновением и тяжестью нейровоспалительных процессов, опосредованных микроглиальными клетками, и развитием ХТЭ. Кратковременная эпизодическая активация нейроглии является защитным механизмом, однако продолжительная хроническая активация приводит к повреждению нейронов и нейродегенеративному состоянию. Как причину хронической активации рассматривают наличие диффузных повреждений аксонов, приводящих к высвобождению воспалительных цитокинов [42]. Тяжесть нейровоспаления пропорциональна времени, в течение которого происходили ЧМТ [43]. В частности, для хемокина CCL2, являющегося частью пронейровоспалительного сигнального каскада и потенциально связанного с привлечением микроглиоцитов к месту повреждения (табл. 1), показана корреляция экспрессии CCL2 и продолжительностью спортивной карьеры в американском футболе, одного из видов спорта, для которого характерна высокая вероятность ЧМТ [43]. Таким образом, оценка уровня экспрессии хемокинов, задействованных в нейровоспалении, может стать важным диагностическим маркером для своевременного установления ХТЭ [35].

НЕЙРОГЛИЯ И ЗАНЯТИЯ СПОРТОМ, НЕ СВЯЗАННЫЕ С РИСКАМИ ЧМТ

Помимо важной роли микроглии в травматических видах спорта с высоким риском ЧМТ, следует рассмотреть динамику состояния глии в других видах спорта, непосредственно несвязанных с ЧМТ, а также при выполнении физических упражнений. В частности, вне зависимости от конкретной спортивной дисциплины, адаптация к физическим нагрузкам обеспечивает нейрофизиологические изменения, нейропротекторные механизмы которых остаются плохо изучены. Считается, что так называемые «аэробные тренировки», к которым относятся бег, езда на велосипеде или плавание, а также тренировки с отягощениями (силовые упражнения), способны улучшать состояние нервной системы за счет нейропластичности, включающей в себя как образование новых нейронных связей, так и реорганизацию уже существующих [56]. Например, адаптация глиальных клеток к физическим упражнениям характеризуется лучшей проводимостью нервных сигналов в моторную кору, что было показано на спортсменах-пловцах [57]. Аэробные упражнения усиливают активность нейронов, моноаминергическую и нейротрофическую передачу, улучшают когнитивные и двигательные функции, а также процессы, опосредующие нейропластичность – развитие нейроглии, миелинизацию и экспрессию генов и факторов роста, связанных с пластичностью нервной системы, что было исследовано на выборках здоровых участников исследований [58, 59]. Изучение нейроглии и процессов нейропластичности является перспективным направлением по причине не только возможного улучшения двигательных и когнитивных функций, но также и профилактики симптомов нейродегенеративных расстройств, таких как рассеянный склероз и болезни Паркинсона и Альцгеймера [60, 61].

Улучшение когнитивной эффективности спортсменов включает в себя более высокое внимание и восприятие информации. В частности, упражнения, оказывающие влияние на сердечно-сосудистую систему, рассматриваются как подход для улучшения когнитивных функций благодаря повышению гуморальных факторов, увеличению мозгового кровотока и воздействию на синапсы, нейроглию и процессы миелинизации, что было показано при рандомизированном исследовании на выборке здоровых мужчин и женщин [62]. Влияние физических нагрузок отражается на синтезе нейротрофического фактора мозга (BDNF), инсулиноподобного фактора роста (IGFs), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), а также маркеров нейровоспаления, таких как С-реактивный белок и цитокины [56, 63]. Данные молекулы потенциально могут быть использованы в качестве маркеров эффективности физических упражнений в отношении нейропластичности. Также возможна связь между структурно-функциональными изменениями мозга и когнитивной активностью и обучением [64].

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НЕЙРОГЛИИ НА МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМАХ

Помимо данных на людях, важную информацию о роли нейроглии в мозге при спорте можно получить на животных, в том числе в экспериментальных моделях нейротравмы. Например, у трансгенных мышей, экспрессирующих изоформу тау-белка человека (hTau) на фоне вызванных в течение 6 месяцев легких ЧМТ, наблюдается повышенная потеря кортикальных нейронов [34, 65]. При моделировании сильных ЧМТ нехронического характера у мышей отмечаются таупатия, аксонопатия, хроническое воспаление и нейродегенерация [34]. У мышей линий C57BL/6 и hTau через 3 и 6 месяцев после получения хронических сотрясений мозга отмечаются дефицит пространственной памяти, повреждение аксонов, нарушения нейроглиальной активации и истончение мозолистого тела [36]. При этом у них выявлена менее плотная упаковка миелиновых волокон, дегенерация аксонов, демиелинизация и скопления нейроглиаль-

ных клеток, особенно в области мозолистого тела. Электронная микроскопия выявила наличие электронно-плотных скоплений в клетках нейроглии, что, предположительно, может быть связано с фагоцитированием дегенерированных аксонов [36]. Для нейроглии также характерно изменение профиля микроглиальных и астроглиальных клеток: у мышей с ЧМТ отмечено увеличение клеточных ядер, отростки олигодендриальных и микроглиальных клеток содержат фаголизосомы и электронно-плотные включения, а также снижен гетерохроматин в ядрах клеток нейроглии, что является маркером повышенной транскрипционной активности [36]. Возможно, олигодендроциты, обладая высокой метаболической активностью и восприимчивостью к воспалениям, играют более важную роль именно при хроническом характере получаемых травм, а не эпизодических ЧМТ [36]. На примере изменений целостности аксонов и нейроглиальной активности в животных моделях проявляется зависимость между ЧМТ и изменением состояния нервной системы в целом и нейроглии, в частности. Таким образом, изучение состояния нейроглии является важнейшим аспектом для изучения последствий ЧМТ.

Кроме того, необходимо учитывать специфику спортивных травм при их моделировании на животных: например, спортивные травмы не всегда связаны с острыми и тяжелыми воздействиями на череп, которые чаще всего применяются в эксперименте. Травмы, получаемые во время спортивных мероприятий, зачастую представляют собой слабые, но регулярные воздействия [66] – как, например, импульсные удары высокой частоты на фоне быстрого изменения скорости поворота головы у профессиональных футболистов [67]. Моделирование последствий ЧМТ определенных видов спорта на данный момент довольно затруднительно по ряду причин. В частности, животная модель должна учитывать длительную продолжительность получения ударов во времени, подвергаться ударам легкой степени воздействия, а сами сотрясения мозга должны соответствовать низкому уровню смертности [68]. На данный момент существуют три подхода к моделированию спортивных травм мозга на животных: модифицированный сброс веса, боковой удар и модифицированный кортикальный удар, которые, в отличие от традиционных моделей ЧМТ, более валидны с точки зрения биомеханики и моделирования инерционной силы удара [66].

Другой аспект спортивной деятельности – регулярность физических нагрузок и их эффекты на ЦНС – также возможно исследовать на животных моделях. Так, на грызунах показано, что регулярные упражнения улучшают пространственную память и снижают депрессивно- и тревожно-подобное поведение, что может быть связано с коррекцией нейроглии [69, 70], особенно если учесть преимущественно астроцитарную природу синтеза ключевого мозгового нейротрофина BDNF, что происходит при регулярных физических нагрузках. Физические упражнения могут модулировать функции астроцитов и микроглии, как показано на линии мышей-модели болезни Альцгеймера [71]. Пролиферация и активация микроглии могут также модулироваться упражнениями на выносливость, улучшая функциональность микроглии. Так, мышцы с 8-недельной беговой нагрузкой отличаются более активным формированием микроглии в коре мозга и гиппокампе [72–74]. Реакция астроцитов на физические упражнения также отличается активацией пролиферации и экспрессии GFAP, способствуя нейрогенезу, нейропластичности и улучшению когнитивных функций за счет улучшения нейронных связей [75, 76]. Физическая активность, в частности, аэробные и силовые упражнения, могут обладать терапевтическим и реабилитационным потенциалом для поддержания ЦНС. Так, умеренные беговые нагрузки в течение нескольких дней у крыс снижают гибель нейронов и уровень воспаления, активируя врожденный иммунитет [77, 78]. Длительные беговые нагрузки также снижают провоспалительные цитокины на грызунах в модели болезни Альцгеймера, патология которой связана с накоплением амилоида-бета (A β) [79–81].

Кроме изучения влияния упражнений на различные патологические состояния при том или ином заболевании ЦНС, животные модели используются для исследования эффективности упражнений при старении. Старение – процесс, который сопровожда-

ется вялотекущим хроническим воспалением, тяжесть которого со временем возрастает из-за увеличения количества дисфункциональных клеток иммунитета [82]. У грызунов старение сопровождается воспалительными процессами и дисбалансом синтеза цитокинов, если животное ведет малоподвижный образ жизни, а беговые нагрузки, наоборот, снижают данные нарушения и улучшают память [69, 83–86]. И хотя наблюдается дозозависимость физических нагрузок и проявляемых позитивных эффектов, даже краткие эпизоды физической активности благоприятно влияют на соотношение про- и противовоспалительных цитокинов в гиппокампе старых крыс [85]. В то же время роль глиальных маркеров и процессов при старении мозга на фоне ЧМТ и физических нагрузок различной тяжести и периодичности остается малоизученной и требует дальнейших исследований с использованием животных моделей.

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ МАРКЕРОВ НЕЙРОГЛИИ

Одной из проблем выявления нейрпатологий, связанных с получением ЧМТ, является диагностика ХТЭ посмертно путем гистологического анализа. Поэтому важна разработка методов прижизненной диагностики для лучшего понимания патофизиологии и разработки курсов лечения и реабилитации [42]. Функционально значимые маркеры могут стать ключевым инструментом для оценки состояния и работоспособности ЦНС при тех или иных патологических состояниях или при получении спортивных травм. Определение функционально значимых маркеров нейроглии представляет собой сложную задачу, одной из основных проблем которой является разнообразие и гетерогенность глиальных клеток, что усложняет выделение универсальных маркеров для каждого типа нейроглии. В целом существует ряд молекулярных маркеров, специфических для астроцитов, олигодендроцитов и микроглии (табл. 1), однако их роль и значимость при оценке дисфункций ЦНС у спортсменов при получении травм (в том числе ЧМТ) и без них остается неясной.

В целом поиск и определение значимых молекулярно-генетических маркеров глиальных клеток представляет собой актуальную, но сложную задачу. Нейроглия обладает высокой степенью гетерогенности как внутри различных типов клеток, так и внутри каждого отдельно взятого функционального кластера, усложняя выделение и изоляцию чистых клеточных субпопуляций. Технические ограничения при изоляции клеток могут вносить потеря клеток и контаминация соседними типами клеток. Другой проблемой является недостаток информации о молекулярных механизмах функций различных типов нейроглии, что затрудняет их точное определение и интерпретацию результатов.

Несмотря на данные проблемы, для различных видов нейроглии известны отдельные молекулярные маркеры, которые можно использовать для первичной оценки функционального состояния нервной системы спортсмена при получении ЧМТ. С другой стороны, их недостаточно для более достоверного и точного определения диагноза, а также для мониторинга в период восстановления. Именно поэтому необходимо дальнейшее изучение и выявление функционально значимых молекулярных путей клеток нейроглии при ЧМТ и их последствиях, как с использованием подходов изучения на человеке, так и с использованием подходящих модельных объектов. Разработка новых подходов анализа, в первую очередь – анализа селективных биомаркеров, отражающих функциональный статус нейроглии и нервной системы в целом, может представить новые перспективы для более точного и надежного выявления нейродегенеративных процессов на ранних стадиях развития болезни. Несмотря на ряд проблем, применение глиальных молекулярных маркеров, отражающих физиологический статус спортсмена при травмах или в период восстановления, является важной задачей как для фундаментального развития нейробиологии и спортивной физиологии, так и для прикладного использования в спорте.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (А. В. К.), проведение исследования (А. В. Ч., К. В. А., В. С. Н., А. В. К.), обсуждение результатов (А. В. Ч., Я. Р. Б., А. С. Ш., М. М. К., А. В. К.), написание и редактирование манускрипта (А. В. Ч., М. М. К., К. В. А., В. С. Г., Б. М. Ю., А. В. К.), одобрение финальной версии (А. В. Ч., Я. Р. Б., М. М. К., А. С. Ш., В. С. Н., Б. М. Ю., А. В. К.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Научно-технологического 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. Allen NJ, Lyons DA (2018) Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* (1979) 362: 181–185.
<https://doi.org/10.1126/science.aat0473>
2. Kettenmann H, Verkhratsky A (2011) Neuroglia, der lebende Nervenkit. *Fortschritte der Neurol Psychiatr* 79: 588–597.
<https://doi.org/10.1055/s-0031-1281704>
3. Rodriguez JJ, Verkhratsky A (2011) Neuroglial roots of neurodegenerative diseases? *Mol. Neurobiol.* 43: 87–96.
<https://doi.org/10.1007/s12035-010-8157-x>
4. Zhou B, Zuo YX, Jiang RT (2019) Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther* 25: 665–673.
<https://doi.org/10.1111/cns.13123>
5. Garcia-Caceres C, Balland E, Prevot V, Luquet S, Woods SC, Koch M, Horvath TL, Yi CX, Chowen JA, Verkhratsky A, Araque A, Bechmann I, Tschöp MH (2019) Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat Neurosci* 22: 7–14.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0286-y>
6. Westergaard T, Rothstein JD (2020) Astrocyte Diversity: Current Insights and Future Directions. *Neurochem Res* 45: 1298–1305.
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-02959-7>
7. Fan YY, Huo J (2021) A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochem Int* 148: 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105080>
8. Brenner M, Messing A (2021) Regulation of GFAP Expression. *ASN Neuro* 13: 1–32.
<https://doi.org/10.1177/1759091420981206>
9. Hubbard WB, Greenberg S, Norris C, Eck J, Lavik E, Vandevord P (2017) Distinguishing the Unique Neuropathological Profile of Blast Polytrauma. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2017/5175249>
10. Michetti F, Clementi ME, Di Liddo R, Valeriani F, Ria F, Rende M, Di Sante G, Romano Spica V (2023) The S100B Protein: A Multifaceted Pathogenic Factor More Than a Biomarker. *Int J Mol Sci* 24: 1–15.
<https://doi.org/10.3390%2Fijms24119605>
11. Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM (2016) Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab* 36: 513–538.
<https://doi.org/10.1177/0271678X15617172>
12. Olczak M, Niderla-Bielińska J, Kwiatkowska M, Samojłowicz D, Tarka S, Wierzbą-Bobrowicz T (2017) Tau protein (MAPT) as a possible biochemical marker of traumatic brain injury in postmortem examination. *Forensic Sci Int* 280: 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.09.008>

13. *Hostenbach S, D'haeseleer M, Kooijman R, De Keyser J* (2016) The pathophysiological role of astrocytic endothelin-1. *Prog Neurobiol* 144: 88–102.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.04.009>
14. *Yang Y, Videnyky S, Jin L, Jie C, Lorenzini I, Frankl M, Rothstein JD* (2011) Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. *Glia* 59: 200–207.
<https://doi.org/10.1002/glia.21089>
15. *Kinoshita M, Okuno T* (2023) Autoimmune-mediated astrocytopathy. *Inflamm Regen* 43: 1–39.
<https://doi.org/10.1186/s41232-023-00291-5>
16. *Lee HG, Wheeler MA, Quintana FJ* (2022) Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nat Rev Drug Discov* 21: 339–358.
<https://doi.org/10.1038/s41573-022-00390-x>
17. *Lawrence JM, Schardien K, Wigdahl B, Nonnemacher MR* (2023) Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. *Acta Neuropathol Commun* 11: 1–28.
<https://doi.org/10.1186/s40478-023-01526-9>
18. *Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y* (2019) Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. *Cells* 8: 1–23.
<https://doi.org/10.3390/cells8111424>
19. *Zhou B, Zhu Z, Ransom BR, Tong X* (2021) Oligodendrocyte lineage cells and depression. *Mol Psychiatry* 26: 103–117.
<https://doi.org/10.1038/s41380-020-00930-0>
20. *Elbaz B, Popko B* (2019) Molecular Control of Oligodendrocyte Development. *Trends Neurosci* 42: 263–277.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.01.002>
21. *Philips T, Rothstein JD* (2017) Oligodendroglia: Metabolic supporters of neurons. *J Clin Invest* 127: 3271–3280.
<https://doi.org/10.1172/JCI90610>
22. *Vidal-Irriago A, Radford RAW, Aramideh JA, Maurel C, Scherer NM, Don EK, Lee A, Chung RS, Graeber MB, Morsch M* (2022) Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Front Immunol* 13: 3270–3280.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.997786>
23. *Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J* (2018) Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 21: 1359–1369.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
24. *Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT* (2014) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci* 17: 400–406.
<https://doi.org/10.1038/nn.3641>
25. *Ling H, Hardy J, Zetterberg H* (2015) Neurological consequences of traumatic brain injuries in sports. *Mol Cell Neurosci* 66: 114–122.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.03.012>
26. *Kwon HS, Koh SH* (2020) Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9: 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
27. *Zhou T, Liu Y, Yang Z, Ni B, Zhu X, Huang Z, Xu H, Feng Q, Lin X, He C, Liu X* (2021) IL-17 signaling induces iNOS+ microglia activation in retinal vascular diseases. *Glia* 69: 2644–2657.
<https://doi.org/10.1002/glia.24063>
28. *Rauf A, Badoni H, Abu-Izneid T, Olatunde A, Rahman MM, Painuli S, Semwal P, Wilairatana P, Mubarak MS* (2022) Neuroinflammatory Markers: Key Indicators in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 27: 3194–3219.
<https://doi.org/10.3390/molecules27103194>
29. *Loane DJ, Byrnes KR* (2010) Role of Microglia in Neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7: 366–377.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63954-7.00028-8>
30. *McKee AC, Abdolmohammadi B, Stein TD* (2018) The neuropathology of chronic traumatic encephalopathy. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V. 297–307.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63954-7.00028-8>
31. *Ильин НП, Галстян ДС, Демин КА, Капурев АВ* (2023) Поведенческие, геномные и нейрoхимические нарушения в модели нейротравмы на взрослых рыбах зебрaдaниo (*Danio rerio*). *Рос физиол журн* 109: 1699–1717. [*Ilyin NP, Galstyan DS, Demin KA, Kalueff AV* (2023) Behavioral, Genomic and neurochemical deficits in the model of neurotrauma in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Russ J Physiol* 109: 1699–1717. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813923110043>

32. Лихтерман ЛБ, Потапов АА, Клевно ВА, Кравчук АД, Охлопков ВА (2016) Последствия черепно-мозговой травмы. Судебная медицина 2:4–20. [Likhтерman LB, Potapov AA, Klevno VA, Kravchuk AD, Okhlopov VA (2016) Consequences of traumatic brain injury. Russ J Forens Med 2: 4–20. (In Russ)].
<https://doi.org/10.19048/2411-8729-2016-2-4-4-20>
33. Johnson VE, Stewart W, Smith DH (2013) Axonal pathology in traumatic brain injury. Exp Neurol 246: 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.013>
34. Pan J, Connolly ID, Dangelmajer S, Kintzing J, Ho AL, Grant G (2016) Sports-related brain injuries: Connecting pathology to diagnosis. Neurosurg Focus 40: 1–16.
<https://doi.org/10.3171/2016.1.FOCUS15607>
35. Cherry JD, Tripodis Y, Alvarez VE, Huber B, Kiernan PT, Daneshvar DH, Mez J, Montenegro PH, Solomon TM, Alasco ML, Stern RA, McKee AC, Stein TD (2016) Microglial neuroinflammation contributes to tau accumulation in chronic traumatic encephalopathy. Acta Neuropathol Commun 4: 112.
<https://doi.org/10.1186/s40478-016-0382-8>
36. Ojo JO, Mouzon B, Algamal M, Leary P, Lynch C, Abdullah L, Evans J, Mullan M, Bachmeier C, Stewart W, Crawford F (2016) Chronic repetitive mild traumatic brain injury results in reduced cerebral blood flow, axonal injury, gliosis, and increased T-tau and tau oligomers. J Neuropathol Exp Neurol 75: 636–655.
<https://doi.org/10.1093/jnen/nlw035>
37. Vanlallie TB (2019) Traumatic brain injury (TBI) in collision sports: Possible mechanisms of transformation into chronic traumatic encephalopathy (CTE). Metabolism 100: 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.07.007>
38. Armstrong RC, Mierzwa AJ, Sullivan GM, Sanchez MA (2016) Myelin and oligodendrocyte lineage cells in white matter pathology and plasticity after traumatic brain injury. Neuropharmacology 110: 654–659.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.04.029>
39. Bernaciková MM Degenerative Brain Changes in Athletes Department of Kinesiology Degree programme: Phys Educat and Sport 1–84.
40. Michinaga S, Koyama Y (2021) Pathophysiological responses and roles of astrocytes in traumatic brain injury. Int J Mol Sci 22: 1–17.
<https://doi.org/10.3390/ijms22126418>
41. Senaratne N, Hunt A, Sotman E, Grey MJ (2022) Biomarkers to aid the return to play decision following sports-related concussion: a systematic review. J Concussion 6: 205970022110707.
<https://doi.org/10.1177/20597002211070735>
42. Lucke-Wold BP, Turner RC, Logsdon AF, Bailes JE, Huber JD, Rosen CL (2014) Linking traumatic brain injury to chronic traumatic encephalopathy: Identification of potential mechanisms leading to neurofibrillary tangle development. J. Neurotrauma 31: 1129–1138.
<https://doi.org/10.1089/neu.2013.3303>
43. Cherry JD, Babcock KJ, Goldstein LE (2020) Repetitive Head Trauma Induces Chronic Traumatic Encephalopathy by Multiple Mechanisms. Semin Neurol 40: 430–438.
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1713620>
44. Baird LC, Newman CB, Volk H, Svinth JR, Conklin J, Levy ML (2010) Mortality resulting from head injury in professional boxing. Neurosurgery 67: 1444–1450.
<https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e3181e5e2cd>
45. Shahim P, Tegner Y, Marklund N, Blennow K, Zetterberg H (2018) Neurofilament light and tau as blood biomarkers for sports-related concussion. Neurology 90: E1780–E1788.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005518>
46. Siman R, Shahim P, Tegner Y, Blennow K, Zetterberg H, Smith DH (2015) Serum SNTF Increases in Concussed Professional Ice Hockey Players and Relates to the Severity of Postconcussion Symptoms. J Neurotrauma 32: 1294–1300.
<https://doi.org/10.1089/neu.2014.3698>
47. McCrea M, Broglio SP, McAllister TW, Gill J, Giza CC, Huber DL, Harezlak J, Cameron KL, Houston MN, McGinty G, Jackson JC, Guskiewicz K, Mihalik J, Brooks MA, Duma S, Rowson S, Nelson LD, Pasquina P, Meier TB, Foroud T, Katz BP, Saykin AJ, Campbell DE, Svoboda SJ, Goldman J, Difiori J (2020) Association of Blood Biomarkers with Acute Sport-Related Concussion in Collegiate Athletes: Findings from the NCAA and Department of Defense CARE Consortium. JAMA Netw Open 3: 1919771–1919771.
<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.19771>
48. Agoston D V., McCullough J, Aniceto R, Lin IH, Kamnaksh A, Eklund M, Graves WM, Dunbar C, Engall J, Schneider EB, Leonessa F, Duckworth JL (2022) Blood-Based Biomarkers of Repetitive, Subconcussive Blast Overpressure Exposure in the Training Environment: A Pilot Study. Neurotrauma Rep 3: 479–490.
<https://doi.org/10.1089/neur.2022.0029>

49. Stern RA, Daneshvar DH, Baugh CM, Daniel Seichepine MR, Montenegro PH, David Riley BO, Nathan Fritts BG, Julie Stamm BM, Clifford Robbins BA, Lisa McHale B, Irene Simkin E, Thor Stein MD, Alvarez VE, Goldstein LE, Budson AE, Kowall NW, Nowinski CJ, Robert Cantu AC, McKee AC (2013) Clinical presentation of chronic traumatic encephalopathy. *Neurology* 13: 1122–1129.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a55f7f>
50. Albayram O, Herbert MK, Kondo A, Tsai CY, Baxley S, Lian X, Hansen M, Zhou XZ, Lu KP (2016) Function and regulation of tau conformations in the development and treatment of traumatic brain injury and neurodegeneration. *Cell Biosci* 6: 1–6.
<https://doi.org/10.1186/s13578-016-0124-4>
51. Goetzl EJ, Yaffe K, Peltz CB, Ledreux A, Gorgens K, Davidson B, Granholm AC, Mustapic M, Kapogiannis D, Tweedie D, Greig NH (2020) Traumatic brain injury increases plasma astrocyte-derived exosome levels of neurotoxic complement proteins. *FASEB J* 34: 3359–3366.
<https://doi.org/10.1096/fj.201902842R>
52. Arvanitis DN, Behar A, Drougard A, Roulet P, Davy A (2014) Cortical abnormalities and non-spatial learning deficits in a mouse model of CranioFrontoNasal syndrome. *PLoS One* 9: 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088325>
53. Michinaga S, Kimura A, Hatanaka S, Minami S, Asano A, Ikushima Y, Matsui S, Toriyama Y, Fujii M, Koyama Y (2018) Delayed Administration of BQ788, an ETB Antagonist, after Experimental Traumatic Brain Injury Promotes Recovery of Blood-Brain Barrier Function and a Reduction of Cerebral Edema in Mice. *J Neurotrauma* 35: 1481–1494.
<https://doi.org/10.1089/neu.2017.5421>
54. Michinaga S, Inoue A, Yamamoto H, Ryu R, Inoue A, Mizuguchi H, Koyama Y (2020) Endothelin receptor antagonists alleviate blood-brain barrier disruption and cerebral edema in a mouse model of traumatic brain injury: A comparison between bosentan and ambrisentan. *Neuropharmacology* 175: 1481–1494.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108182>
55. Armstrong RC, Mierzwa AJ, Marion CM, Sullivan GM (2016) White matter involvement after TBI: Clues to axon and myelin repair capacity. *Exp Neurol* 275: 328–333.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.011>
56. Hortobágyi T, Vetrovsky T, Balbim GM, Sorte Silva NCB, Manca A, Deriu F, Kolmos M, Kruuse C, Liu-Ambrose T, Radák Z, Vácsi M, Johansson H, dos Santos PCR, Franzén E, Granacher U (2022) The impact of aerobic and resistance training intensity on markers of neuroplasticity in health and disease. *Ageing Res Rev* 80: 1–18.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101698>
57. Vasile L, Gheorghe N (2018) adaptation of swimmers by using progressive systems. *Discobolul* 14: 5–9.
58. El-Sayes J, Harasym D, Turco C V., Locke MB, Nelson AJ (2019) Exercise-Induced Neuroplasticity: A Mechanistic Model and Prospects for Promoting Plasticity. *Neuroscientist* 25: 65–85.
<https://doi.org/10.1177/1073858418771538>
59. Contreras-Osorio F, Campos-Jara C, Martínez-Salazar C, Chiroso-Ríos L, Martínez-García D (2021) brain sciences Systematic Review Effects of Sport-Based Interventions on Children's Executive Function: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Brain Sci* 11: 755–773.
<https://doi.org/10.3390/brainsci>
60. Petzinger G, Fisher B, McEwen S, Beeler S, Walsh J, Jakowec MENT (2013) Cognitive Circuitry in Parkinson's Disease. *Lancet Neurol* 12: 716–726.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70123-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70123-6)
61. Pahlavani HA (2023) Exercise therapy to prevent and treat Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 15: 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1243869>
62. Lehmann N, Villringer A, Taubert M (2020) Colocalized white matter plasticity and increased cerebral blood flow mediate the beneficial effect of cardiovascular exercise on long-term motor learning. *J Neurosci* 40: 2416–2429.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2310-19.2020>
63. Coelho FGDM, Vital TM, Stein AM, Arantes FJ, Rueda AV, Camarini R, Teodorov E, Santos-Galduróz RF (2014) Acute aerobic exercise increases brain-derived neurotrophic factor levels in elderly with Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 39: 401–408.
<https://doi.org/10.3233/JAD-131073>
64. Sampaio-Baptista C, Scholz J, Jenkinson M, Thomas AG, Filippini N, Smit G, Douaud G, Johansen-Berg H (2014) Gray matter volume is associated with rate of subsequent skill learning after a long term training intervention. *Neuroimage* 96: 158–166.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.03.056>

65. Uryu K, Laurer H, McIntosh T, Praticò D, Martinez D, Leight S, M-Y Lee V, Trojanowski JQ (2002) Repetitive Mild Brain Trauma Accelerates A Deposition, Lipid Peroxidation, and Cognitive Impairment in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Amyloidosis. *J Neurosci* 22: 446–454. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-02-00446.2002>
66. Hiskens MI, Pérez MA, Schneiders AG, Vella RK, Fenning AS (2019) Modeling sports - related mild traumatic brain injury in animals – A systematic review. *J Neurosci Res* 10: 1194–1222. <https://doi.org/10.1002/jnr.24472>
67. Viano DC, Säljö A (2009) Concussion in professional football animal model of brain injury – part 15. *Neurosurgery* 64: 1162–1173. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000345863.99099.C7>
68. Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Herrera-Mundo N, Viano DC, Kuhn DM (2014) Animal models of sports-related head injury bridging the gap between pre-clinical research and clinical reality. *J Neurochem* 10.1111: 1–16. <https://doi.org/10.1111/jnc.12690>
69. Mela V, Mota BC, Milner M, McGinley A, Mills KHG, Kelly ÁM, Lynch MA (2020) Exercise-induced re-programming of age-related metabolic changes in microglia is accompanied by a reduction in senescent cells. *Brain Behav Immun* 87: 413–428. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.01.012>
70. Agudelo LZ, Femenía T, Orhan F, Porsmyr-Palmertz M, Goiny M, Martinez-Redondo V, Correia JC, Izadi M, Bhat M, Schuppe-Koistinen I, Pettersson AT, Ferreira DMS, Krook A, Barres R, Zierath JR, Erhardt S, Lindskog M, Ruas JL (2014) Skeletal muscle PGC-1 α 1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. *Cell* 159: 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.051>
71. Barad Z, Augusto J, Kelly ÁM (2023) Exercise-induced modulation of neuroinflammation in ageing. *J Physiol* 601: 2069–2084. <https://doi.org/10.1113/JP282894#support-information-section>
72. Ehninger D, Kempermann G (2003) Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cerebr Cortex* 13: 845–851. <https://doi.org/10.1093/cercor/13.8.845>
73. Olah M, Ping G, De Haas AH, Brouwer N, Meerlo P, Van Der Zee EA, Biber K, Boddeke HWGM (2009) Enhanced hippocampal neurogenesis in the absence of microglia T cell interaction and microglia activation in the murine running wheel model. *Glia* 57: 1046–1061. <https://doi.org/10.1002/glia.20828>
74. Vukovic J, Colditz MJ, Blackmore DG, Ruitenberg MJ, Bartlett PF (2012) Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. *J Neurosci* 32: 6435–6443. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5925-11.2012>
75. Fahimi A, Baktir MA, Moghadam S, Mojabi FS, Sumanth K, McNerney MW, Ponnusamy R, Salehi A (2017) Physical exercise induces structural alterations in the hippocampal astrocytes: exploring the role of BDNF-TrkB signaling. *Brain Struct Funct* 222: 1797–1808. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1308-8>
76. Saur L, Baptista PPA, De Senna PN, Paim MF, Nascimento P Do, Ilha J, Bagatini PB, Achaval M, Xavier LL (2014) Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. *Brain Struct Funct* 219: 293–302. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0500-8>
77. Liu X, Liu J, Zhao S, Zhang H, Cai W, Cai M, Ji X, Leak RK, Gao Y, Chen J, Hu X (2016) Interleukin-4 Is Essential for Microglia/Macrophage M2 Polarization and Long-Term Recovery after Cerebral Ischemia. *Stroke* 47: 498–504. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.012079>
78. Zhang Y, Cao RY, Jia X, Li Q, Qiao L, Yan G, Yang J (2016) Treadmill exercise promotes neuroprotection against cerebral ischemia–reperfusion injury via downregulation of pro-inflammatory mediators. *Neuropsychiatr Dis Treat* 12: 3161–3173. <https://doi.org/10.2147/NDT.S121779>
79. Leem YH, Lee YI, Son HJ, Lee SH (2011) Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23. *Biochem Biophys Res Commun* 406: 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.046>
80. Zhang J, Guo Y, Wang Y, Song L, Zhang R, Du Y (2018) Long-term treadmill exercise attenuates A β burdens and astrocyte activation in APP/PS1 mouse model of Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett* 666: 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.12.025>

81. Zhang S shan, Zhu L, Peng Y, Zhang L, Chao F lei, Jiang L, Xiao Q, Liang X, Tang J, Yang H, He Q, Guo Y jing, Zhou C ni, Tang Y (2022) Long-term running exercise improves cognitive function and promotes microglial glucose metabolism and morphological plasticity in the hippocampus of APP/PS1 mice. *J Neuroinflammat* 19: 1–21.
<https://doi.org/10.1186/s12974-022-02401-5>
82. Yousefzadeh MJ, Flores RR, Zhu Y, Schmiechen ZC, Brooks RW, Trussoni CE, Cui Y, Angelini L, Lee KA, McGowan SJ, Burrack AL, Wang D, Dong Q, Lu A, Sano T, O'Kelly RD, McGuckian CA, Kato JI, Bank MP, Wade EA, Pillai SPS, Klug J, Ladiges WC, Burd CE, Lewis SE, LaRusso NF, Vo N V, Wang Y, Kelley EE, Huard J, Stromnes IM, Robbins PD, Niedernhofer LJ (2021) An aged immune system drives senescence and ageing of solid organs. *Nature* 594: 100–105.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03547-7>
83. Connolly MG, Bruce SR, Kohman RA (2022) Exercise Duration Differentially Effects Age-related Neuroinflammation and Hippocampal Neurogenesis. *Neuroscience* 490: 275–286.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.03.022>
84. Dallagnol KMC, Remor AP, da Silva RA, Prediger RD, Latini A, Aguiar AS (2017) Running for REST: Physical activity attenuates neuroinflammation in the hippocampus of aged mice. *Brain Behav Immun* 61: 31–35.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.07.159>
85. Gomes Da Silva S, Santos P, Simões R, Mortara RA, Scorza FA, Cavaleiro EA, Da M, Naffah-Mazzacoratti G, Arida RM (2013) Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. *J Neuroinflammat* 10: 1–6.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-61>
86. Lovatel GA, Elsner VR, Bertoldi K, Vanzella C, Moysés F dos S, Vizuite A, Spindler C, Cechinel LR, Netto CA, Muotri AR, Siqueira IR (2013) Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, Neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 101: 94–102.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.01.007>

Molecular-Genetic Markers of Neuroglia in Traumatic Brain Injury and their Use for Assessing Functional Status of Sportsmen

A. V. Cherepanova^{a,*}, Y. R. Bravy^a, A. V. Karabelsky^a, and M. M. Kotova^a,
A. S. Sherbakova^b, K. V. Apukhtin^a, V. S. Nikitin^a, M. Yu. Bobrov^a, and A. V. Kalueff^{a,c}

^aSirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Russia

^bKuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia

^cInstitute of Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

*e-mail: anesthesia.cher@gmail.com

Neuroglia performs multiple important functions including maintaining brain homeostasis, metabolism, neuroprotection and modulating neurotransmission. Studying the role of neuroglia is necessary to understand the development of pathological neurodegenerative processes, as well as the restoration of nervous tissue during inflammation or injury. However, the analysis of neuroglial processes is complicated by its high heterogeneity and the lack of a system of biomarkers that make it possible to unambiguously assess the functional state of the nervous system. Here, we analyze data on clinically significant molecular genetic markers of different types of neuroglia, and the prospects for their use in sport physiology, including the assessment of athletes following traumatic brain injuries of varying severity and other types of sport-related traumas.

Keywords: astroglia, oligodendroglia, microglia, biomarkers of neuroglia, sports physiology

ОБЗОРЫ

ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ-ГОРМОН И ОРГАНЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

© 2024 г. И. В. Майбородин¹ *, И. О. Маринкин¹, Н. В. Оноприенко¹,
В. И. Майбородина¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия
*E-mail: imai@mail.ru

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.
После доработки 30.05.2024 г.
Принята к публикации: 30.05.2024 г.

В результате литературного поиска рассмотрены физиологические аспекты влияния гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) на органы иммунитета, такие как красный костный мозг, тимус, селезенка и лимфатические узлы. Применение препаратов ГнРГ приводит к замещению красного костного мозга желтым с возрастанием содержания лимфоидных и миелоидных клеток-предшественников. Параллельно идут процессы остеопороза из-за повышенной резорбции кости с соответствующими изменениями кальциевого обмена и уменьшением плотности различных костных тканей. Вместе с этим есть работы, сообщающие об отсутствии влияния ГнРГ на плотность костей и изменения обмена кальция. ГнРГ действует на тимус и при внутриутробном развитии, и в постнатальном онтогенезе, и при воспалении, и при процессах возрастной инволюции. Не только ГнРГ вызывает изменения тимуса, возможно влияние тимуса на систему ГнРГ. Прямое действие ГнРГ на клетки селезенки не было выявлено, но масса органа изменялась в результате активной иммунизации против ГнРГ в эксперименте. К сожалению, очень немногие статьи демонстрируют физиологические механизмы иммуномодуляции в таких условиях. В любом случае явная недостаточность и противоречивость публикаций по каждому из аспектов эффектов ГнРГ свидетельствует об их малой изученности, целесообразности дальнейшего продолжения не только прикладных, но и фундаментальных исследований в связи с возможной высокой перспективностью создания систем управления иммунитетом.

Ключевые слова: гонадотропин-рилизинг-гормон, органы иммунитета, красный костный мозг, тимус, селезенка, лимфатические узлы, лимфоциты

DOI: 10.31857/S0869813924070022, **EDN:** BEDARH

ВВЕДЕНИЕ

Гонадотропин-рилизинг-гормон (ГнРГ) – гипоталамический декапептид, опосредующий синтез и высвобождение гипофизарного лютеинизирующего гормона (ЛГ). Подобные полипептиды действуют главным образом на переднюю долю гипофиза, вызывая кратковременное быстрое увеличение выброса гонадотропина. Однако, когда агонисты ГнРГ вводят длительно в высоких супрафизиологических дозах, становится

очевидным парадоксальный эффект чрезмерной стимуляции гипофиза. Метаболические механизмы включают в себя десенсibilизацию гипофиза к ГнРГ, подавление рецепторов ГнРГ (ГнРГР) в клетках-мишенях, резкое падение объема выделяемого ЛГ, нарушение механизмов физиологической обратной связи, при этом снижается высвобождение самого ГнРГ.

Репродуктивное здоровье организма программируется путем становления и развития физиологических систем в критические периоды. Регуляторные механизмы характеризуются высокой чувствительностью к различным внутренним и внешним факторам, что обеспечивает возможность коррекции нарушений [1]. ГнРГ играет важную роль в контроле репродукции, но его действие в нерепродуктивных процессах менее известно. Уже давно признано, что недостаток мужских половых гормонов влияет на иммунную систему [2], а ГнРГР широко распространены в тканях позвоночных, включая клетки основных иммунных органов (тимус, лимфатические узлы (ЛУ), селезенка) млекопитающих [3–5], в том числе и человека [6]. Интересно, что стимуляция ГнРГР приводила к обострению системной красной волчанки у кастрированных самок мышей [7, 8], лечение антагонистом ГнРГР отсрочило возникновение аутоиммунного диабета [9] и увеличило выживаемость мышей, склонных к волчанке [7]. Кроме того, введение беременным крысам агониста ГнРГР вызывало увеличение продукции интерферона (ИФН)- γ и снижение – интерлейкина (ИЛ)-4 анти-CD3-стимулированными лимфоцитами [3], что указывает на стимуляцию провоспалительных ответов Th1-типа. Необходимо отметить, что Poulsen с соавт. [10] проверили такие эффекты на мышинных макрофагах и лимфоцитах, но не смогли обнаружить каких-либо изменений после блокады или стимуляции ГнРГР.

Действие нескольких агонистов и антагонистов ГнРГ, обладающих высокой биологической активностью, было исследовано на крысах, мышах, кроликах и обезьянах. Существуют значительные видовые различия ответа животных на влияние этих пептидов. Из всех исследованных позвоночных крысы являются наиболее чувствительными. Интенсивность ответа на агонисты ГнРГ, по-видимому, зависит от чувствительности гипофиза и присутствия ГнРГР в органах-мишенях. Результаты, полученные на животных моделях, требуют тщательной интерпретации, прежде чем можно будет делать прогнозы относительно их возможных последствий для человека [4, 11].

Основное внимание в современных исследованиях уделяется изучению влияния ГнРГ на половую систему женщин (или самок в эксперименте) и на лечение рака предстательной железы у мужчин. Данные по органам, не связанным с репродукцией, в том числе иммунной системы, есть, но они не обобщены, тогда как присутствие ГнРГР в иммунокомпетентных органах и клетках позволяет не только целенаправленно влиять на них, но, видимо, и управлять иммунитетом в целом. В связи с этим проведен поиск литературы в базах данных “PubMed” и “PubMed Health”.

ДЕЙСТВИЕ АГОНИСТОВ ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ-ГОРМОНА НА КРАСНЫЙ КОСТНЫЙ МОЗГ

Для изучения распределения ГнРГ, меченного галлием-67 (^{67}Ga), крыс выводили из эксперимента через точные промежутки времени (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 24 и 48 ч) после инъекции. Самая высокая эффективная поглощенная доза, из общей поглощенной дозы на весь организм в 5.26 mGy, приходилась на легкие (2.73 mSv). Органами, получившими следующие по величине дозы, были стенка мочевого пузыря (1.59 mSv), печень (0.80 mSv) и костный мозг (0.52 mSv). Отмечено низкое поглощение метки в мышцах и крови [12].

Липидная фракция костного мозга через 1 год после применения ГнРГ у подростков для подавления полового созревания увеличилась на 8.4% при снижении на 0.1%

в контрольной группе. Изменения объема жировой ткани костного мозга могут лежать в основе изменений костномозговых мезенхимальных стволовых клеток [13]. Самкам мышей препубертатного возраста в возрасте 4 недель вводили только аналог ГнРГ или с добавлением тестостерона, начиная с 6 (раннее половое созревание) или 8 недель (позднее половое созревание). Обнаруженное ожирение костного мозга у мышей, получавших аналог ГнРГ, обращалось вспять под действием тестостерона [14]. Необходимо отметить обнаруженную Rouach с соавт. [15] выраженную инфильтрацию костного мозга адипоцитами у 25-дневных овариэктомированных самок крыс, такая инфильтрация сохранялась при введении аналога ГнРГ.

Согласно результатам Goldberg с соавт. [16], уменьшение синтеза половых гормонов после применения агониста ГнРГ ацетата лейпролида способствовало возрастанию содержания лимфоидных и миелоидных клеток-предшественников в костном мозге, но Ataya с соавт. [17] не наблюдали заметного увеличения количества клеток костного мозга. В другой работе [10] авторы не нашли прямого влияния ГнРГ на секрецию цитокинов мышиными костномозговыми макрофагами.

С применением ГнРГ тесно связаны не только изменения кроветворных структур, но и давно известная *остеопения*. Лечение аналогами ГнРГ местно-распространенного рака предстательной железы или с метастазами в ЛУ и с показаниями к андрогенной блокаде сопровождается ускорением потери минеральной плотности костной ткани с соответствующим увеличением содержания кальция в моче натошак и более частым образованием конкрементов в почках [18]. В результате подавления полового созревания у подростков агонистами ГнРГ в течение 12 месяцев плотность костной ткани поясничного отдела позвоночника снизилась на 0.29 по данным двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии и периферической количественной компьютерной томографии, но увеличилась на 0.48 в контрольной группе. Аналогичные результаты наблюдали при изменении плотности трабекулярной костной ткани большеберцовой кости (–4.1% после ГнРГ, +3.2% в контроле) [13]. После инъекций аналога ГнРГ самкам мышей препубертатного возраста через 16 недель наблюдали меньший объем трабекулярной кости и снижение массы и прочности кортикальной костной ткани [14].

У крыс с дефицитом эстрогенов при воздействии бусерелином (25 мкг/кг массы тела в день, подкожно) диагностировали остеопению, что подтверждено изменениями обмена ^{45}Ca . Бусерелин-опосредованная эстрогенная недостаточность приводит к потере костной ткани из-за ее повышенной резорбции, в отличие от андрогенной недостаточности, когда подобные изменения косей обусловлены главным образом супрессией остеоформирования [19]. Но Rouach с соавт. [15] считают, что дефицит эстрадиола являлся доминирующим фактором, препятствующим потере костной массы у овариэктомированных крыс (модель менопаузального остеопороза), сопутствующие изменения соотношения фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и ЛГ, вызванные ГнРГ, играют в этой ситуации некоторую модулирующую, хотя и сложную роль: было меньше делящихся клеток и хондробластов в костной ткани голени, структура зоны роста и трабекул была нарушена, хотя при этом отмечено возрастание объема трабекулярной ткани. Авторы предполагают, что в процессах потери костной массы в постменопаузальном периоде значительную роль играют высокие уровни ФСГ. Необходимо отметить, что по данным Bélisle с соавт. [20] при старении происходит снижение скорости высвобождения ЛГ на фоне применения бусерелина. Об остеопорозе после применения бусерелина сообщают и другие исследователи. Бусерелин даже применяют для моделирования остеопороза в эксперименте. Трехмесячные самцы крыс Sprague-Dawley ($n = 46$) были разделены на три экспериментальные группы: интактные, введение бусерелина и орхиэктомия. В группе с инъекциями бусерелина ежедневно вводили подкожно либо физиологический раствор, либо препарат в дозе 25 мкг/кг или 75 мкг/кг. В группе орхиэктомии животных подвергали либо ложной операции, либо кастрации. Крыс выводили из эксперимента после трехмесячного наблюдения. Структурный ги-

стоморфометрический анализ показал, что как бусерелин (25 мкг/кг и 75 мкг/кг), так и орхиэктомия значительно снижали объем трабекулярной костной ткани и значительно увеличивали расстояние между трабекулами по сравнению с соответствующими контролями ($p < 0.05$). Также в обеих группах с использованием бусерелина и после орхиэктомии были значительно увеличены количество остеокластов и площадь эродированной костной поверхности. Бусерелин вызывал у крыс ухудшение микроархитектуры кости и увеличивал ее резорбцию, аналогичную орхиэктомии, через три месяца терапии [21–24]. По данным Tobias с соавт. [25] введение бусерелина в течение 30, 60 или 90 дней уменьшало объем губчатой кости из-за уменьшения как количества, так и толщины трабекул. Однако Cirkel с соавт. [26] не обнаружили влияния бусерелина на метаболизм костной ткани при измерении содержания в крови кальцитонина и гормонов паращитовидной железы. Chen с соавт. [27] сообщали о нормальном уровне сывороточного кальция и фосфатов в конце лечения эндометриоза бусерелином.

Можно отметить, что после введения препараты ГнРГ накапливаются в красном костном мозге и способствуют замещению его кроветворных структур жировой тканью с возрастанием (или отсутствием изменений, по данным различных исследователей) содержания лимфоидных и миелоидных клеток-предшественников, что, скорее всего, связано с компенсацией функций выключенных из гемо- и лейкопоза отделов. Параллельно жировому перерождению красного костного мозга идут процессы остеопороза из-за повышенной резорбции с соответствующими изменениями кальциевого обмена и уменьшением плотности различных костных тканей, что, несомненно, обусловлено дисбалансом половых гормонов после применения ГнРГ. Вызванную применением ГнРГ остеопению даже используют в качестве модели постменопаузального остеопороза. Вместе с этим есть работы, сообщающие как об отсутствии влияния ГнРГ на плотность костной ткани и изменения обмена кальция, так и о том, что дефицит эстрадиола являлся доминирующим фактором, препятствующим потере костной массы у овариэктомированных крыс (рис. 1).

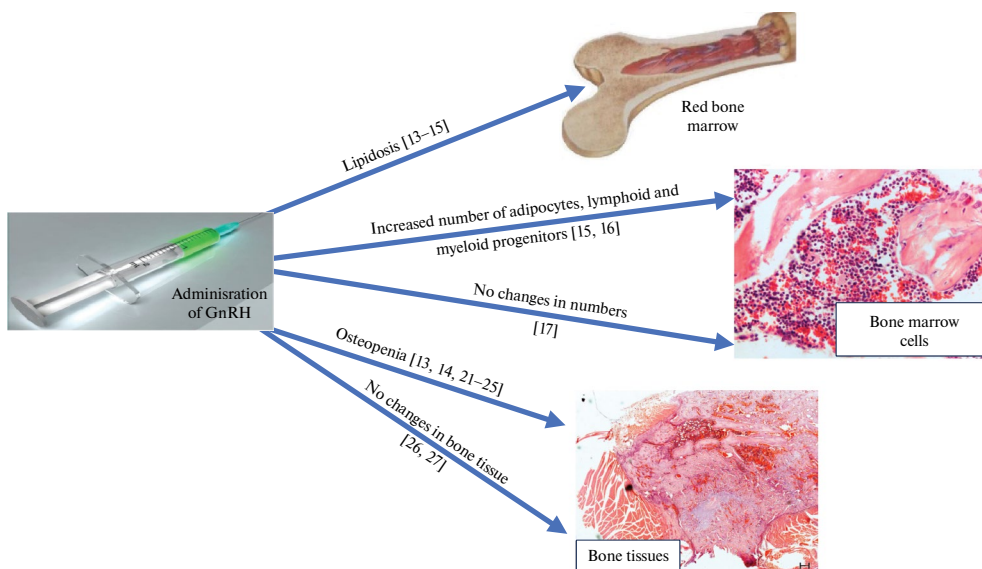


Рис. 1. Влияние ГнРГ на красный костный мозг и костную ткань.

ИЗМЕНЕНИЯ ТИМУСА ПОД ВЛИЯНИЕМ ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ-ГОРМОНА

Физиология тимуса, основного лимфоидного органа, в котором генерируются Т-клетки, контролируется гормонами. Поскольку ГнРГ экспрессируется в тимусе, весьма вероятно прямое действие этого гормона на его клетки, включая инволюцию органа. Иммуногистохимией показаны положительные реакции на аннексин А5 (биомаркер ГнРГ) в крупных эпителиальных клетках мозгового вещества тимуса у самцов крыс в возрасте 30 дней, экспрессия продолжалась до возраста 180 дней. Синтез ГнРГ в тимусе может влиять на эпителиальные клетки тимуса и после полового созревания. Тимус подвергается прогрессирующей возрастной атрофии с потерей генерируемых и экспортируемых клеток, поэтому разрабатывается гормональная терапия на основе ГнРГ в качестве альтернативной стратегии омоложения органа, а также увеличения пролиферации тимоцитов и миграции зрелых Т-клеток в периферические лимфоидные органы [5, 28].

L-аргинин (250, 500, 1000 мг/кг внутривенно в течение 7 дней) у мышей уменьшает клеточность и относительную массу тимуса, подавляет гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ на эритроциты овцы, способствует фрагментации ДНК. Липополисахарид (ЛПС) вызывает острую атрофию тимуса и апоптоз его клеток – явление, которое связано с иммунной дисфункцией и плохой выживаемостью во время сепсиса. Внутривенное введение мышам 100 мкг ЛПС приводило к фрагментации ДНК клеток тимуса, его инволюции, уменьшению субпопуляции CD4+8+ тимоцитов. Аналоги ГнРГ оказывали тимопоэтическое действие и обладали иммуностимулирующими свойствами. Предварительное лечение лейпролидом (100 мкг/мышь, подкожно) значительно ослабляло индуцированные ЛПС и L-аргинином изменения тимуса и иммунологических показателей. Эффект лейпролида не изменился у кастрированных или овариэктомированных мышей, это позволило предположить, что наблюдаемый эффект лейпролида не зависел от половых стероидов [29, 30].

ГнРГ и его аналоги модулируют тяжесть системной красной волчанки у мышей. Вместе с этим имеются данные, что ГнРГ изменяет тяжесть заболевания сексуально-диморфным образом даже у мышей с гонадэктомией. Введение ГнРГ приводило к обострению волчанки у овариэктомированных самок, тогда как на кастрированных самцов это не оказывало влияния. Возможно, что такие отличия обусловлены гендерными различиями иммунитета и/или аутоиммунного заболевания [8].

Тимус может регенерировать у интактных старых крыс в результате введения бусерелина. Старым самцам крыс подкожно имплантировали осмотические насосы, содержащие раствор бусерелина на цитратном буфере, который поступал по 1 мкг/ч в течение 28 дней. В контроле вводили только буферный раствор или использовали хирургическую кастрацию. Через 28 дней после введения буферного раствора крысы имели маленькие вилочковые железы с жировым перерождением, которые были плохо структурированы и с очень узкой полоской коркового вещества. Животные, получавшие бусерелин и после хирургической кастрации, имели относительно большие многоклеточные вилочковые железы, а также атрофированные семенники и придатки половых органов. Гистологически тимус выглядел нормальным, с широкой, заполненной тимоцитами корой и четко выраженной кортикомедуллярной границей. Концентрация тестостерона в сыворотке крови была одинаковой при орхиэктомии и лечении бусерелином. Таким образом, возможно восстановление тимуса у старых крыс, увеличение его массы и повторное появление четко выраженных коркового и мозгового вещества. Общий маркер Т-клеток показал снижение содержания положительных клеток у стареющих крыс и увеличение числа таких клеточных элементов после химической кастрации [32].

Аналогичный результат был достигнут, когда Hirakata с соавт. [33] 3 половозрелым самцам минисвиней инъецировали аналог ГнРГ Люпрон Депо в дозе 45 мг на 70–80 кг массы тела. Препарат вызывал гормональные изменения, приводившие к макроскопической и гистологической регенерации тимуса старых животных в течение 2 месяцев, о чем свидетельствовали восстановление ювенильной архитектуры тимуса и увеличение численности клеток.

Длительное введение крысам агонистов ГнРГ способствует увеличению влажной и сухой (абсолютной и относительной) массы тимуса. Возрастание массы органа было связано с продолжительностью лечения, максимальное увеличение произошло примерно через 18 дней после начала эксперимента. Изменения тимуса, по-видимому, не связаны с усилением митотической активности, что доказано исследованием включения меченного тритием тимидина в ткань тимуса и тимусную ДНК. Гистологическое исследование и компьютерный морфометрический анализ показали увеличение соотношения коркового и мозгового вещества тимуса, наиболее выраженное на 10- и 18-й дни лечения. У крыс, получавших агонист ГнРГ, увеличивалась концентрация тимозина альфа-1, но не тимозина бета-4. Масса тимуса отрицательно коррелировала с массой яичников и матки, относительной массой надпочечников, сывороточным эстрадиолом, ЛГ и положительно – с содержанием тимозина альфа-1. Введение экзогенного эстрогена нормализовало увеличение массы тимуса, вызванное агонистами ГнРГ [17].

Наоборот, в экспериментах Poulsen с соавт. [10] агонист ГнРГ лейпролид приводил к снижению массы тимуса мышей по сравнению с результатами двусторонней орхизомии или применения антагониста дегареликса.

Абляция половых стероидов с использованием ацетата лейпролида увеличивала количество развивающихся тимоцитов в тимусе за счет усиления пролиферации незрелых тимоцитов, но точные механизмы и потенциальная роль местных ГнРГР не выяснены. Хотя в периферических миелоидных компартментах наблюдали незначительные различия, усиленное восстановление тимуса после лечения ГнРГ и аллогенной трансплантации костного мозга способствовало ускоренному восстановлению численности периферических Т-клеток, преимущественно в компартменте наивных Т-клеток. Это приводило к усилению функций Т-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro*. Но реакция «трансплантат против хозяина» не усугублялась ГнРГ, сохранялась и активность реакции «трансплантат против опухоли». Поскольку ГнРГ позволяет проводить обратимую (и временную) абляцию половых стероидов, этот способ терапии представляет собой новый подход к обращению вспять атрофии тимуса и повышению иммунитета после иммуносупрессии [2, 16, 34].

Подобные изменения были выявлены, когда 4 взрослым самцам павианов-гамадрилов подкожно вводили Люпрон Депо (11.25 мг) и наблюдали в течение 3 месяцев. По данным МРТ объем тимуса увеличился, также согласно результатам гистологического исследования в корковом и мозговом веществе органа возросло число клеток. Кроме того, на протяжении 50 дней после применения ГнРГ наблюдали значительный подъем количества CD4⁺/CD45RA(hi⁺) клеток в периферической крови, а проточная цитометрия ткани тимуса выявила выраженный рост процентного содержания CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов [35].

Активная иммунизация против ГнРГ подавляет размножение животных и является альтернативой хирургической кастрации, которая влияет на соотношение субпопуляций Т-лимфоцитов. Иммунизация увеличивала размер и массу тимуса, привела к росту количества тимоцитов и усилила миграцию CD4⁺ и CD8⁺ клеток из тимуса в кровь и селезенку. Но при этом иммунизация не оказала существенного влияния на наивные CD4⁺ и CD8⁺ лимфоциты, а также на CD4⁺ и CD8⁺ активированные клетки памяти [36].

Двадцатидневных крыс иммунизировали против ГнРГ трижды каждые 2 недели. По сравнению с контрольной группой, количество CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ и CD4⁺CD8⁺ клеток увеличилось ($p < 0.05$), тогда как содержание CD4⁻CD8⁻ и CD4⁺CD25⁺ лим-

фоцитов снизилось ($p < 0.05$). Иммунизация также увеличивала относительную массу тимуса ($p < 0.05$) и концентрации ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17 и ИФН- γ в сыворотке крови [37].

Трехнедельные крысы-самцы Sprague-Dawley были иммунизированы против ГнРГ. В тимусе иммунизированных крыс концентрация ГнРГ повышалась, иммуногистохимия показала более сильное взаимодействие ткани органа с антителами к ГнРГР, ФСГР и ЛГР по сравнению с контролем. Активация Т-лимфоцитов к ГнРГ произошла в течение первого месяца, о чем свидетельствовало увеличение количества CD3+ и CD4+ Т-лимфоцитов ($p < 0.05$) после подавления синтеза тестостерона ($p < 0.01$), которое затем восстанавливалось и поддерживалось на соответствующем уровне на втором месяце. Дифференцировка Т-лимфоцитов в тимусе, наоборот, была снижена в течение первого месяца после иммунизации, на что указывало значительное снижение количества CD3+ клеток с последующим восстановлением и увеличением численности в более поздние моменты времени вместе с CD4+ Т-лимфоцитами. Иммунизация против ГнРГ влияла на количество тимоцитов только в первые моменты времени, в периферической крови число Т-лимфоцитов сначала снизилось, но затем было пополнено за счет вновь экспортированных клеток из тимуса, что в конечном итоге восстановило содержание таких клеточных элементов до нормального уровня [38, 39].

Комбинированное введение фактора роста кератиноцитов (KGF, keratinocyte growth factor) с ацетатом лейпролида нормализовало количество субпопуляций эпителиальных клеток тимуса и его архитектуру при дефиците Т-лимфоцитов, наблюдаемом при аллогенной трансплантации костного мозга. Тимопоэз и активность тимуса были сверхнормальными, что приводило к ускоренному периферическому восстановлению наивных CD4+ и CD8+ Т-клеток. Комбинированная терапия, кроме того, способствовала кооперативному взаимодействию между Т- и В-лимфоцитами и обеспечивала гуморальный ответ В-клеток на CD4-зависимый неоантиген вскоре после трансплантации. *In vivo* антигенспецифические реакции CD8+ Т-клеток и клиренс живого патогена были выше при комбинированной терапии по сравнению с отдельным введением каждого препарата [40].

Специфические высокоаффинные ГнРГР были обнаружены на культивируемых лимфоцитах свиней, но не в свежих клетках. Появление таких ГнРГР в количестве, доступном для измерения, происходит через 48 ч культивирования [41]. Для идентификации и характеристики ГнРГР в тимусе крыс в качестве йодированного лиганда использовали очень сильный и стабильный агонист ГнРГ бусерелин. Специфическое связывание ГнРГ с препаратами тимусной мембраны являлось насыщаемым процессом, зависящим как от времени, так и от температуры инкубации, но заметно отличалось своей низкой аффинностью от связывания с ГнРГР гипофиза или яичника. Взаимодействие было оптимальным в отсутствие хелатообразующих агентов (EDTA) или ионов двухвалентных металлов и линейно возрастало с увеличением концентрации белка, причем, оказалось специфичным и для агонистов, и для антагонистов ГнРГ. Преинкубация тимоцитов крысы с ГнРГ в течение 20 ч вызывала значительное дозозависимое увеличение пролиферативного ответа на митоген, отслеживаемое по включению ^3H -тимидина. Используя нативный ГнРГ можно было также вызвать стимулирующее воздействие на тот же параметр, хотя требовались гораздо более высокие концентрации, чем с его агонистами. Одновременное добавление антагониста устраняло эффект ГнРГ на тимоциты. Специфическая активность орнитиндекарбоксилазы при стимуляции лектином также была значительно повышена в присутствии ГнРГ в культурах тимоцитов крысы [42].

Вестерн-блоттинг и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией позволили идентифицировать ГнРГР в тимусе крысиных эмбрионов с пиком экспрессии на 17–18-й эмбриональный день. Блокирование внутриутробных ГнРГР на 17-е сутки антагонистом гормона подавляло индуцированный конканавалином А пролиферативный ответ Т-клеток у взрослых животных. ГнРГ (10^{-7} М) повышал экспрессию мРНК ИЛ-4,

ИЛ-10, ИЛ-1 β , ИФН γ и фактора некроза опухоли (TNF, tumor necrosis factor)- α в тимусе 18-дневных эмбрионов после культивирования *ex vivo* в течение 24 ч. Увеличение уровня мРНК цитокинов в тимусе сопровождалось возрастанием количества CD4 $^{+}$ Т-хелперов. Возможно регуляторное или морфогенетическое влияние ГнРГ на внутриутробное развитие тимуса плода, опосредованное синтезом тимических цитокинов [43].

Не только ГнРГ вызывает изменения тимуса. Есть данные о роли пептидов и цитокинов тимуса в регуляции ГнРГ-системы в норме и при развитии воспаления, вызванного эндотоксинами, у взрослых животных. Также возможно влияние провоспалительных цитокинов на миграцию и дифференцировку ГнРГ-нейронов в пренатальном онтогенезе [44].

В связи с присутствием ГнРГ в тимусе не вызывает сомнений влияние гормона на структуру и функции этого центрального органа иммунитета. ГнРГ действует на тимус и при внутриутробном развитии, и в постнатальном онтогенезе, и при воспалении, и при процессах возрастной инволюции. В связи с этим ГнРГ успешно применяют для коррекции иммунодефицита, связанного со спонтанным или индуцированным изменением тимуса. Однако здесь имеется определенное противоречие: если в отношении красного костного мозга ГнРГ вызывает изменения, соответствующие возрастным (жировое перерождение), то при воздействии на тимус, согласно данным литературы, происходит обратное развитие возрастной атрофии, регенерация с омоложением органа. Под влиянием ГнРГ увеличивается пролиферация тимоцитов (или, по другим данным, не изменяется) и экспорт Т-клеток в кровь и периферические лимфоидные органы, усиливаются функции Т-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro*, возрастают концентрации ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17 и ИФН- γ в сыворотке крови. Эффекты, оказываемые ГнРГ на тимус, не зависят от секреции половых гормонов, а сексуально-диморфные отличия, по-видимому, связаны с гендерными различиями иммунитета. Необходимо отметить наличие публикаций, описывающих снижение массы тимуса после применения агониста ГнРГ. Не только ГнРГ вызывает изменения тимуса, возможно влияние тимуса на систему ГнРГ как у взрослых животных, так и в эмбриональном периоде.

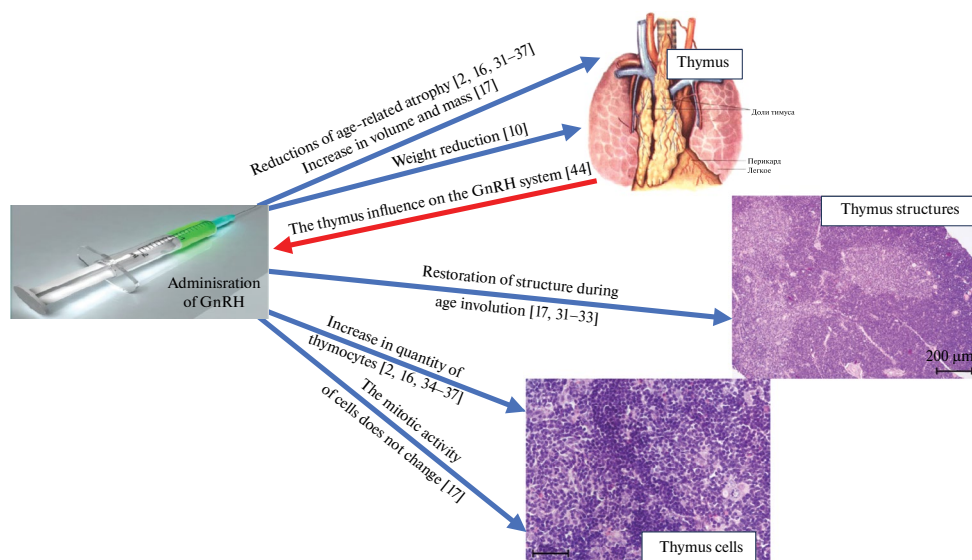


Рис. 2. Изменения тимуса после применения ГнРГ.

ЭФФЕКТЫ ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ-ГОРМОНА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ СЕЛЕЗЕНКИ

У кастрированных самцов мышей агонист ГнРГ лейпролид, но не антагонист дегареликс, уменьшал массу селезенки. Не было обнаружено прямого воздействия препаратов на пролиферацию спленоцитов [10], тогда как активная иммунизация против ГнРГ увеличивала относительную массу органа ($p < 0.05$) и процент CD3+ Т-клеток в ней [36, 37].

После введения самкам мышей препубертатного возраста агониста ГнРГ люпрона (ацетат лейпролида длительного действия) количество лейкоцитов в периферической крови значительно снизилось с уменьшением количества как гранулоцитов, так и лимфоцитов, кроме того, стало меньше содержание Т- и В-клеток, хотя количество В-лимфоцитов уменьшилось более заметно. В селезенке численность В-клеток также сократилось значительнее, чем Т-лимфоцитов [45].

Самцы свиней, хирургически кастрированные в возрасте от 5 до 6 дней, через 4 и 5 месяцев имели меньше лимфоцитов в крови, чем интактный контроль ($p < 0.05$), но лейкограммы животных, иммунизированных против ГнРГ в возрасте 3 и 4 месяцев, от контроля существенно не отличались. Кастрированные свиньи имели в крови более высокий процент CD3+CD4+CD8+ клеток через 4 месяца, тогда как иммунизированные – только спустя 5 месяцев ($p < 0.05$). Относительная масса селезенки была снижена только после иммунизации [46].

Иммунизация баранов против ГнРГ увеличивала его выработку в селезенке за счет устранения ингибирующих эффектов обратной связи со стороны тестостерона. Параллельно с увеличением продукции ГнРГ в селезенке наблюдали экспрессию мРНК ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и TNF- α , а также увеличение численности CD4+, CD8+ и CD19+ лимфоцитов ($p < 0.05$) [47]. Однако согласно результатам исследований Ishikawa [48] и Токиока с соавт. [49], даназол и бусерелин не влияли на активность натуральных киллерных клеток селезенки крыс, ингибированную при экспериментальном эндометриозе, а Ataya с соавт. [17] не наблюдали значительного увеличения массы селезенки).

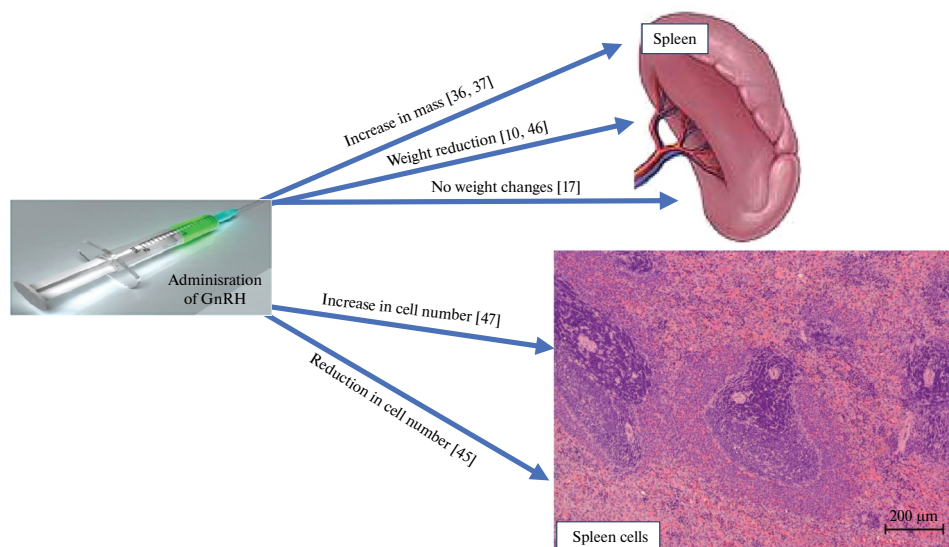


Рис. 3. Селезенка на фоне использования ГнРГ.

Масса селезенки уменьшалась у кастрированных самцов под влиянием агониста гормона и возрастала или снижалась (по разным данным) в результате активной иммунизации против ГнРГ, хотя прямое действие ГнРГ на клетки органа выявлено не было. Также после воздействия ГнРГ зарегистрировано сокращение численности В-клеток в органе и лимфоцитов в периферической крови.

ГОНАДОТРОПИН-РЕЛИЗИНГ-ГОРМОН И ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ ЛИМФОИДНЫЕ ОРГАНЫ И СТРУКТУРЫ

К сожалению, было найдено только очень ограниченное число публикаций о взаимодействии ГнРГ и ЛУ. Rao с соавт. [45] не выявили никаких различий в процентном соотношении клеточных элементов ЛУ самок мышей препубертатного возраста после применения агониста ГнРГ длительного действия, за исключением того, что число В-клеток уменьшилось на 2-й неделе. Но по данным Li с соавт. [36], активная иммунизация против ГнРГ увеличивала долю CD3+ Т-клеток в ЛУ. Кроме того, Сао с соавт. [6] методом количественной ПЦР в реальном времени нашли повышение уровня мРНК и самих протеинов ГнРГ и ГнРГР в материнских ЛУ овец на ранних сроках беременности.

Также необходимо отметить полное отсутствие опубликованных данных о взаимовлиянии ГнРГ и иммунных структур кишечника: Пейеровых бляшек и солитарных лимфоидных фолликулов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, агонисты и аналоги ГнРГ играют все большую роль в медикаментозном лечении различных заболеваний, в том числе и не связанных с репродукцией. Также имеется множество данных, указывающих на взаимодействие ГнРГ с иммунной системой. Применение препаратов ГнРГ приводит к замещению красного костного мозга желтым с возрастанием содержания лимфоидных и миелоидных клеток-предшественников. Параллельно жировому перерождению идут процессы остеопороза из-за повышенной резорбции кости с соответствующими изменениями кальциевого обмена и уменьшения плотности различных костных тканей. Вместе с этим есть работы, сообщающие об отсутствии влияния ГнРГ на плотность костной ткани и изменения обмена кальция. В связи с присутствием ГнРГР в тимусе, гормон действует на орган и при внутриутробном развитии, и в постнатальном онтогенезе, и при воспалении, и при процессах возрастной инволюции. ГнРГ успешно применяют для коррекции иммунодефицита, связанного со спонтанными или индуцированными изменениями тимуса, происходит редукция возрастной атрофии, регенерация с омоложением органа. Под влиянием ГнРГ увеличивается пролиферация тимоцитов и экспорт Т-клеток в кровь и периферические лимфоидные органы, усиливаются функции Т-лимфоцитов *in vivo* и *in vitro*, возрастают концентрации ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17 и ИФН- γ в сыворотке крови. Необходимо отметить публикации, описывающие снижение массы тимуса после применения агониста ГнРГ. Не только ГнРГ вызывает изменения тимуса, возможно влияние тимуса на систему ГнРГ как у взрослых животных, так и в эмбриональном периоде. Прямое действие ГнРГ на клетки селезенки не было выявлено, но масса органа уменьшалась у кастрированных самцов под влиянием агониста гормона и возрастала или снижалась (по разным данным) в результате активной иммунизации против ГнРГ. Также после воздействия ГнРГ сокращается численность В-клеток в органе и лимфоцитов в периферической крови. Явно недостаточны данные о взаимовлиянии ГнРГ с ЛУ и лимфоидными структурами кишечника, тогда как периферические лимфоидные органы играют очень важную роль в инициации и поддержании гуморального иммунитета.

ГнРГ тесно связан с иммунной системой, их прямое и косвенное взаимодействие создает двунаправленную основу для создания необходимых механизмов поддержания гомеостаза. Когда любой из этих элементов дестабилизируется, система изменяется, и трудно определить, какой фактор отвечает за такую реакцию. Возможно, из-за сложности взаимодействия между ГнРГ и иммунитетом обобщение данных затруднено. Использование моделей *in vitro* позволяет определенным образом уточнить некоторые элементы, участвующие в гомеостазе, однако экстраполяция их на модели *in vivo* может привести к ненадежным интерпретациям. При попытке суммирования публикаций о влиянии ГнРГ на иммунную систему выявлено, что многие исследования связаны с фармакологическим применением аналогов или агонистов ГнРГ, но очень немногие статьи демонстрируют физиологические механизмы иммуномодуляции в таких условиях. В любом случае противоречивость публикаций по каждому из аспектов эффектов ГнРГ свидетельствует об их малой изученности, целесообразности дальнейшего продолжения не только прикладных исследований, но и фундаментальных, в связи с возможной высокой перспективностью.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея и дизайн работы – И. В. М., В. И. М. Сбор данных – И. В. М., И. О. М., Н. В. О., В. И. М. Написание текста – И. В. М., В. И. М. Редактирование – И. В. М., И. О. М., Н. В. О., В. И. М.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств государственного задания в рамках бюджетной темы Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН «Фундаментальные основы здоровьесбережения» № 121031300045–2. Финансовой поддержки со стороны кампаний-производителей лекарственных препаратов, а также других спонсоров авторы не получали. 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 декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи. Фрагменты рисунков частично взяты из открытого доступа сети «Интернет», все гистологические препараты – из неопубликованного архива д.м.н., профессора И. В. Майбородина, являющегося соавтором статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zakharova L, Sharova V, Izvolskaia M (2020) Mechanisms of Reciprocal Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-Producing and Immune Systems: The Role of GnRH, Cytokines and Their Receptors in Early Ontogenesis in Normal and Pathological Conditions. *Int J Mol Sci* 22: 114. <https://doi.org/10.3390/ijms22010114>
2. Olsen NJ, Kovacs WJ (1996) Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 17: 369–384. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-4-369>
3. Dixit VD, Yang H, Udhayakumar V, Sridaran R (2003) Gonadotropin-releasing hormone alters the T helper cytokine balance in the pregnant rat. *Biol Reprod* 68: 2215–2221. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.012211>
4. Quintanar JL, Guzmán-Soto I (2013) Hypothalamic neurohormones and immune responses. *Front Integr Neurosci* 7: 56. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00056>

5. *Kawaminami M, Terashima R, Murata T, Chiba S, Kurusu S* (2022) Gonadotropin-releasing hormone stimulation of annexin A5 expression in the thymus of male rats. *J Vet Med Sci* 84: 638–643.
<https://doi.org/10.1292/jvms.22-0052>
6. *Cao N, Cao L, Gao M, Wang H, Zhang L, Yang L* (2021) Changes in mRNA and protein levels of gonadotropin releasing hormone and receptor in ovine thymus, lymph node, spleen, and liver during early pregnancy. *Domest Anim Endocrinol* 76: 106607.
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106607>
7. *Jacobson JD, Nisula BC, Steinberg AD* (1994) Modulation of the expression of murine lupus by gonadotropin-releasing hormone analogs. *Endocrinology* 134: 2516–2523.
<https://doi.org/10.1210/endo.134.6.8194477>
8. *Jacobson JD, Ansari MA, Kinealy M, Muthukrishnan V* (1999) Gender-specific exacerbation of murine lupus by gonadotropin-releasing hormone: potential role of G alpha(q/11). *Endocrinology* 140: 3429–3437.
<https://doi.org/10.1210/endo.140.8.6892>
9. *Ansari MA, Dhar M, Spieker S, Bakht N, Rahman AM, Moore WV, Jacobson JD* (2004) Modulation of diabetes with gonadotropin-releasing hormone antagonists in the nonobese mouse model of autoimmune diabetes. *Endocrinology* 145: 337–342.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-0512>
10. *Poulsen CB, Mortensen MB, Koehling W, Sørensen CB, Bentzon JF* (2016) Differences in Hypercholesterolemia and Atherogenesis Induced by Common Androgen Deprivation Therapies in Male Mice. *J Am Heart Assoc* 5: e002800.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002800>
11. *Thau RB, Limonta P, Schmidt F, Sundaram K* (1985) Species differences in the sensitivity to GnRH analogs. *J Steroid Biochem* 23: 811–817.
[https://doi.org/10.1016/s0022-4731\(85\)80020-0](https://doi.org/10.1016/s0022-4731(85)80020-0)
12. *Shanehsazzadeh S, Lahooti A, Sadeghi HR, Jalilian AR* (2011) Estimation of human effective absorbed dose of 67Ga-cDTA-gonadorelin based on biodistribution rat data. *Nucl Med Commun* 32: 37–43.
<https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e328340b916>
13. *Nasomyont N, Meisman AR, Ecklund K, Vajapeyam S, Cecil KM, Tkach JA, Altaye M, Corathers SD, Conrad LA, Kalkwarf HJ, Dolan LM, Gordon CM* (2022) Changes in Bone Marrow Adipose Tissue in Transgender and Gender Non-Conforming Youth Undergoing Pubertal Suppression: A Pilot Study. *J Clin Densitom* 25: 485–489.
<https://doi.org/10.1016/j.jocd.2022.06.006>
14. *Dubois V, Cíancía S, Doms S, El Kharraz S, Sommers V, Kim NR, David K, Van Dijk J, Valle-Tenney R, Maes C, Antonio L, Decallonne B, Carmeliet G, Claessens F, Cools M, Vanderschueren D* (2023) Testosterone Restores Body Composition, Bone Mass, and Bone Strength Following Early Puberty Suppression in a Mouse Model Mimicking the Clinical Strategy in Trans Boys. *J Bone Miner Res* 38: 1497–1508.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.4832>
15. *Rouach V, Katzburg S, Koch Y, Stern N, Somjen D* (2011) Bone loss in ovariectomized rats: dominant role for estrogen but apparently not for FSH. *J Cell Biochem* 112: 128–137.
<https://doi.org/10.1002/jcb.22908>
16. *Goldberg GL, King CG, Nejat RA, Suh DY, Smith OM, Bretz JC, Samstein RM, Dudakov JA, Chidgey AP, Chen-Kiang S, Boyd RL, van den Brink MR* (2009) Luteinizing hormone-releasing hormone enhances T cell recovery following allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* 182: 5846–5854.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801458>
17. *Ataya KM, Sakr W, Blacker CM, Mutchnick MG, Latif ZA* (1989) Effect of GnRH agonists on the thymus in female rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121: 833–840.
<https://doi.org/10.1530/acta.0.1210833>
18. *Díaz-Convalia E, Arrabal-Polo MA, Cano-García MDC, Domínguez-Amillo A, Canales-Casco N, Arrabal-Martín M* (2018) Risk of renal stone formation in patients treated with luteinising hormone-releasing hormone analogues for prostate cancer: importance of bone metabolism and urine calcium. *Int Urol Nephrol* 50: 419–425.
<https://doi.org/10.1007/s11255-018-1793-1>
19. *Goulding A, Gold E* (1993) Flutamide-mediated androgen blockade evokes osteopenia in the female rat. *J Bone Miner Res* 8: 763–769.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.5650080615>
20. *Bélisle S, Bellabarba D, Lehoux JG, Gallo-Payet N* (1991) The effects of age on the postreceptor regulation of luteinizing hormone secretion by gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Endocrinol* 76: 63–70.
[https://doi.org/10.1016/0303-7207\(91\)90260-y](https://doi.org/10.1016/0303-7207(91)90260-y)

21. *Mohamad NV, Che Zulkepli MAA, May Theseira K, Zulkifli N, Shahrom NQ, Ridzuan NAM, Jamil NA, Soelaiman IN, Chin KY* (2018) Establishing an Animal Model of Secondary Osteoporosis by Using a Gonadotropin-releasing Hormone Agonist. *Int J Med Sci* 15: 300–308. <https://doi.org/10.7150/ijms.22732>
22. *Mohamad NV, Ima-Nirwana S, Chin KY* (2018) Effect of tocotrienol from Bixa orellana (annatto) on bone microstructure, calcium content, and biomechanical strength in a model of male osteoporosis induced by buserelin. *Drug Des Devel Ther* 12: 555–564. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S158410>
23. *Mohamad NV, Soelaiman IN, Chin KY* (2018) Effects of tocotrienol from Bixa orellana (annatto) on bone histomorphometry in a male osteoporosis model induced by buserelin. *Biomed Pharmacother* 103: 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.083>
24. *Mohamad NV, Ima-Nirwana S, Chin KY* (2020) The effects of gonadotropin-releasing hormone agonist (buserelin) and orchidectomy on bone turnover markers and histomorphometry in rats. *Aging Male* 23: 327–334. <https://doi.org/10.1080/13685538.2018.1446075>
25. *Tobias JH, Chambers TJ, Gallagher A* (1994) Effect of administration and subsequent cessation of buserelin on cancellous bone of female rats. *J Bone Miner Res* 9: 1919–1925. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650091211>
26. *Cirkel U, Schweppe KW, Ochs H, Hanker JP, Schneider HP* (1989) LH-RH agonist (buserelin): treatment of endometriosis. Clinical, laparoscopic, endocrine and metabolic evaluation. *Arch Gynecol Obstet* 246: 139–151. <https://doi.org/10.1007/BF00934075>
27. *Chen SC, Ng HT, Tzeng CR, Chao HT, Chang SP, Wei TC, Yang TS* (1991) Buserelin treatment of endometriosis in Chinese women. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 47: 1–6.
28. *Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Lepletier A, Dardenne M* (2016) Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 12: 77–89. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.168>
29. *Ullewar MP, Umathe SN* (2014) Gonadotropin-releasing hormone agonist selectively augments thymopoiesis and prevents cell apoptosis in LPS induced thymic atrophy model independent of gonadal steroids. *Int Immunopharmacol* 23: 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.07.032>
30. *Ullewar MP, Umathe SN* (2016) Gonadotropin-releasing hormone agonist prevents l-arginine induced immune dysfunction independent of gonadal steroids: Relates with a decline in elevated thymus and brain nitric oxide levels. *Nitric Oxide* 57: 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.04.009>
31. *Greenstein BD, Fitzpatrick FT, Kendall MD, Wheeler MJ* (1987) Regeneration of the thymus in old male rats treated with a stable analogue of LHRH. *J Endocrinol* 112: 345–350. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1120345>
32. *Kendall MD, Fitzpatrick FT, Greenstein BD, Khoylou F, Safieh B, Hamblin A* (1990) Reversal of ageing changes in the thymus of rats by chemical or surgical castration. *Cell Tissue Res* 261: 555–564. <https://doi.org/10.1007/BF00313535>
33. *Hirakata A, Okumi M, Griesemer AD, Shimizu A, Nobori S, Tena A, Moran S, Arn S, Boyd RL, Sachs DH, Yamada K* (2010) Reversal of age-related thymic involution by an LHRH agonist in miniature swine. *Transpl Immunol* 24: 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2010.08.001>
34. *Zhao G, Moore DJ, Kim JI, Lee KM, O'Connor MR, Duff PE, Yang M, Lei J, Markmann JF, Deng S* (2011) Inhibition of transplantation tolerance by immune senescence is reversed by endocrine modulation. *Sci Transl Med* 3: 87ra52. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002270>
35. *Scalea JR, Torabi R, Tena A, Tasaki M, Gillon BC, Moran S, Cormack T, Villani V, Shimizu A, Sachs DH, Yamada K* (2014) The rejuvenating effects of leuprolide acetate on the aged baboon's thymus. *Transpl Immunol* 31: 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2014.09.001>
36. *Li D, Yao H, Han X, Cao X, Du X, Meng F, Bu G, Kong F, Song T, Zeng X* (2023) Active immunization against gonadotropin-releasing hormone affects thymic T cell production, migration, and colonization in male rat lymphoid tissue. *J Reprod Immunol* 159: 104132. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2023.104132>
37. *Pan F, Du H, Tian W, Xie H, Zhang B, Fu W, Li Y, Ling Y, Zhang Y, Fang F, Liu Y* (2023) Effect of GnRH immunocastration on immune function in male rats. *Front Immunol* 13: 1023104. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1023104>

38. Su S, Zhou X, Zhang X, Fang F (2017) Effect of gonadotropin-releasing hormone vaccination on T lymphocyte changes in male rats. *J Reprod Immunol* 120: 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.02.001>
39. Su S, Fang F, Liu Y, Li Y, Ren C, Zhang Y, Zhang X (2013) The compensatory expression of reproductive hormone receptors in the thymus of the male rat following active immunization against GnRH. *Gen Comp Endocrinol* 185: 57–66.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.01.013>
40. Kelly RM, Highfill SL, Panoskaltis-Mortari A, Taylor PA, Boyd RL, Holländer GA, Blazar BR (2008) Keratinocyte growth factor and androgen blockade work in concert to protect against conditioning regimen-induced thymic epithelial damage and enhance T-cell reconstitution after murine bone marrow transplantation. *Blood* 111: 5734–5744.
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-136531>
41. Standaert FE, Chew BP, De Avila D, Reeves JJ (1992) Presence of luteinizing hormone-releasing hormone binding sites in cultured porcine lymphocytes. *Biol Reprod* 46: 997–1000.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod46.6.997>
42. Marchetti BI, Guarcello V, Morale MC, Bartoloni G, Farinella Z, Cordaro S, Scapagnini U (1989) Luteinizing hormone-releasing hormone-binding sites in the rat thymus: characteristics and biological function. *Endocrinology* 125: 1025–1036.
<https://doi.org/10.1210/endo-125-2-1025>
43. Melnikova VI, Lifantseva NV, Voronova SN, Zakharova LA (2019) Gonadotropin-Releasing Hormone in Regulation of Thymic Development in Rats: Profile of Thymic Cytokines. *Int J Mol Sci* 20: 4033.
<https://doi.org/10.3390/ijms20164033>
44. Извольская МС, Шарова ВС, Захарова ЛА (2010) Механизмы регуляции гипоталамо-гипофизарной и иммунной систем: роль гонадотропин-рилизинг гормона и иммуномедиаторов. *Извест Рос акад наук Сер биол* (4): 451–461. [*Izvol'skaia MS, Sharova VS, Zakharova LA* (2010) Mechanisms of the hypothalamic-pituitary and immune system regulation: the role of gonadotropin-releasing hormone and immune mediators. *Izv Ros Akad Nauk Ser Biol* (4): 451–461. (In Russ)].
45. Rao LV, Cleveland RP, Ataya KM (1993) GnRH agonist induces suppression of lymphocyte subpopulations in secondary lymphoid tissues of prepubertal female mice. *Am J Reprod Immunol* 30: 15–25.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1993.tb00596.x>
46. Leclercq C, Prunier A, Merlot E (2014) Effects of neonatal surgical castration and immunocastration in male pigs on blood T lymphocytes and health markers. *Animal* 8: 836–843.
<https://doi.org/10.1017/S1751731114000445>
47. Han X, Ren X, Zeng Y, Zhou Y, Song T, Cao X, Du X, Meng F, Tan Y, Liu Y, Feng J, Chu M, Zeng X (2016) Physiological interactions between the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and spleen in rams actively immunized against GnRH. *Int Immunopharmacol* 38: 275–283.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.06.011>
48. Ishikawa N (1995) Changes in natural killer (NK) activity and fertility during the establishment of experimental endometriosis in the rat. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 47: 457–464.
49. Tokuoka S, Mizumoto Y, Ishikawa N, Mitsui C, Makimura N, Hirata J, Furuya K, Kikuchi Y, Nagata I (1995) The effect of danazol and buserelin on natural killer activity in experimental endometriosis of the rat. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 47: 1069–1070.

Gonadotropin-Releasing Hormone and Organs of the Immune System

I. V. Maiborodin^{a, *}, I. O. Marinkin^a, N. V. Onoprienko^a, and V. I. Maiborodina^a

^a*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, The Russian Academy of Sciences,
Siberian Branch, Novosibirsk, Russia*

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

As a result of a literature search, the physiological aspects of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) influence on immune organs, such as red bone marrow, thymus, spleen and lymph nodes, were considered. The use of GnRH drugs leads to the replacement of red bone marrow with yellow one with an increase in the content of lymphoid and myeloid progenitor cells. In parallel, processes of osteoporosis occur due to increased bone resorption with corresponding changes in calcium metabolism and a decrease in the density of various bone tissues. At the same time, there are papers reporting no effect of GnRH on bone density and changes in calcium metabolism. GnRH acts on the thymus during embryonic development, and in postnatal ontogenesis, and during inflammation and age-related involution processes. Not only GnRH causes changes in the thymus; the thymus may also influence on the GnRH system. A direct effect of GnRH on spleen cells had not been detected, but the weight of the organ changed as a result of active immunization against GnRH in experiment. Unfortunately, very few articles demonstrate the physiological mechanisms of immunomodulation in such conditions. In any case, the obvious insufficiency and contradictory of publications on each aspect of GnRH effects indicates that they have been poorly studied, and it's advisable of further continuing not only applied research, but also fundamental investigations, due to its possible high prospects for creating immune control systems.

Keywords: gonadotropin-releasing hormone, immune organs, red bone marrow, thymus, spleen, lymph nodes, lymphocytes

ОБЗОРЫ

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЕТОК МОЗГА
ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ И САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

© 2024 г. М. П. Морозова^{1,*}, И. Г. Савинкова¹, Л. Р. Горбачева^{1,2}

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

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: mormasha@gmail.com

Поступила в редакцию 28.03.2024 г.

После доработки 12.06.2024 г.

Принята к публикации 12.06.2024 г.

Гипергликемия является симптомом и повреждающим фактором при сахарном диабете (СД), приводящим к системным осложнениям в организме, в том числе к макро- и микроангиопатиям головного мозга, нарушению кровоснабжения, появлению очагов нейродегенерации и запуску нейровоспаления. Нервная ткань характеризуется высоким уровнем потребления энергии и высокочувствительна к колебаниям уровня метаболических субстратов. Таким образом, крайне актуальным является исследование влияния высокого уровня глюкозы на функциональное состояние ЦНС. В обзоре предпринята попытка комплексно оценить последствия гипергликемии для клеток мозга. Анализ экспериментальных данных, полученных в *in vivo* и *in vitro* моделях СД, описывающих изменения морфофункционального состояния нейронов, микроглии и астроцитов, показал, что прямое и опосредованное влияние глюкозы в высокой концентрации зависит от типа клеток. Рецепторы и внутриклеточные сигнальные каскады астроцитов и микроглии, опосредующие действие гипергликемии и развитие нейровоспаления, могут выступать в качестве терапевтических мишеней коррекции последствий СД. Поэтому поиск способов модуляции функциональной активности глиальных клеток может оказаться эффективной стратегией для снижения тяжести последствий поражения ЦНС.

Ключевые слова: гипергликемия, астроциты, микроглия, нейроны, нейродегенерация, нейровоспаление, сахарный диабет

DOI: 10.31857/S0869813924070033, **EDN:** BEBJKR

ВВЕДЕНИЕ

Распространенность сахарного диабета (СД) – группы метаболических заболеваний, сопровождающихся увеличением уровня глюкозы в крови, в мире очень широка. Численность больных СД за последние 10 лет увеличилась более чем в 2 раза и к концу 2021 г. превысила 537 млн человек. Согласно прогнозам Международной федерации диабета заболеваемость СД к 2045 г. составит 783 млн человек [1]. Стойкое повышение уровня глюкозы в крови, гипергликемия, приводит к развитию патологических изменений в организме, наиболее опасными из которых являются системные сосудистые

осложнения – микро- и макроангиопатии, обуславливающие развитие диабетической нефропатии, ретинопатии, заболеваний сердечно-сосудистой системы, увеличивающие риск мозговых инсультов и других поражений нервной системы [2]. Именно эти заболевания становятся основной причиной инвалидизации и смертности пациентов с СД [1–3].

ГИПЕРГЛИКЕМИЯ И МЕТАБОЛИЗМ ГЛЮКОЗЫ

Гипергликемия запускает несколько метаболических сигнальных путей, которые приводят к активации воспалительного ответа, выбросу провоспалительных цитокинов и гибели клеток, что ведет к осложнениям СД [4] (рис. 1). Основной путь, который активируется в ответ на гипергликемию – это полиоловый путь окисления глюкозы, в котором при помощи фермента альдозоредуктазы глюкоза превращается в осмотически активные сорбитол и фруктозу, что ведет к осмотическому стрессу и повреждению эндотелиальных клеток [5, 6]. При хронической гипергликемии из-за снижения эффективности метаболизма глюкозы посредством гликолиза и цикла Кребса [7] активируются пути, которые обычно малозначимы в нормогликемических условиях, но становятся основными путями для переноса глюкозы при гипергликемии. Такие пути приводят к продукции активных форм кислорода (АФК), запуску окислительного стресса и последующему развитию осложнений СД [7] (рис. 1).

Гипергликемия запускает гликолиз и дополнительно усиливает синтез диацилглицерола (ДАГ), который активирует протеинкиназу С (ПКС) [4]. ПКС способствует активации НАДФН-оксидазы, что приводит к запуску окислительно-восстановительных реакций, лежащих в основе окислительного стресса. Как следствие, АФК и конечные продукты гликирования накапливаются в клетках, что приводит к запуску гибели клеток [4]. В настоящее время показано, что у пациентов с СД гипергликемия приводит к появлению АФК вследствие активации ферментов митохондриальной дыхательной цепи, ксантиноксидаз, липоксигеназ, циклооксигеназ, NO-синтаз и пероксидаз [4], а развивающийся окислительный стресс ведет к гибели клеток (рис. 1). Так, например, высокий уровень глюкозы при СД через увеличение продукции АФК активирует апоптоз β -клеток поджелудочной железы, секретирующих инсулин, что приводит к еще более выраженной гипергликемии [8]. И апоптоз, и некроптоз играют важную роль в прогрессировании осложнений СД, поскольку поражаются ткани сердца, сетчатки, почек и нервной системы [9–11]. Усиленный синтез ДАГ и активация ПКС запускают множество внутриклеточных сигнальных механизмов, вызывающими увеличение проницаемости сосудистой стенки, нарушение эндотелий-зависимой дилатации сосудов и активации окислительного стресса [5, 6].

Под влиянием гипергликемии также происходит активация гексозаминового пути метаболизма глюкозы, что проявляется в изменении активности транскрипционных факторов, включая специфический белок 1 (Sp1) и транскрипционного ядерного фактора каппа-В (NF- κ B) в эндотелиальных клетках [6]. В эндотелии Sp1 индуцирует транскрипцию ингибитора активации плазминогена 1 (PAI-1), что снижает тромборезистентность сосудистой стенки, а активация NF- κ B способствует выработке провоспалительных цитокинов. Активация NF- κ B высоким уровнем глюкозы может реализовываться за счет различных механизмов: активации toll-подобного рецептора 4 (TLR4) [12], что ведет к фосфорилированию киназного комплекса I κ B, высвобождению субъединицы p65 NF- κ B [13] и транслокации её из цитозоля в ядро [12]. Также гипергликемия через ERK1/2-путь вызывает перемещение индуцируемого гипоксией фактора 1-альфа (HIF-1 α) в ядро, где он регулирует экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [14, 15]. Таким образом, функциональный профиль эндотелия сосудов на фоне хронической гипергликемии сдвигается в сторону вазоконстрикторного ответа, прокоагулянтной активности и повышенной адгезии.

Нарастание патологических изменений в организме на фоне развития СД также связано с прямым токсическим действием хронической гипергликемии, которая приводит к образованию конечных продуктов гликирования (advanced glycation end-products, AGE-продукты) вне и внутри клетки [5]. Высокий уровень глюкозы индуцирует образование метилглиоксала, который модифицирует белки посредством гликирования аминогрупп белков [16]. Одним из основных продуктов является гликированный гемоглобин (HbA1c), который используется в качестве маркера тяжести сердечно-сосудистых заболеваний и неблагоприятного прогноза у пациентов с СД. Однако повышенный уровень глюкозы в крови приводит к гликированию не только гемоглобина, но и компонентов гликокаликса эндотелия сосудов и нарушению его функции, что объясняет изменение кровоснабжения и питания всех органов и систем в организме [17, 18]. Стойкая гипергликемия и образование AGE-продуктов стимулирует иммунную систему, например, через продукцию АФК возможна активация эндотелия, мезангиальных клеток нефронов и макрофагов [5, 19, 20]. Активация AGE-рецепторов через транскрипционный фактор NF-κB может индуцировать воспаление [21]. Существенный вклад в развитие осложнений СД на фоне гипергликемии вносит активность поли(АДФ-рибозо)-полимеразы (PARP) [22, 23]. Показано, что гипергликемия и неэтерифицированные жирные кислоты стимулируют PARP, что приводит к повреждению нейролеммы и периксисов сетчатки [24].

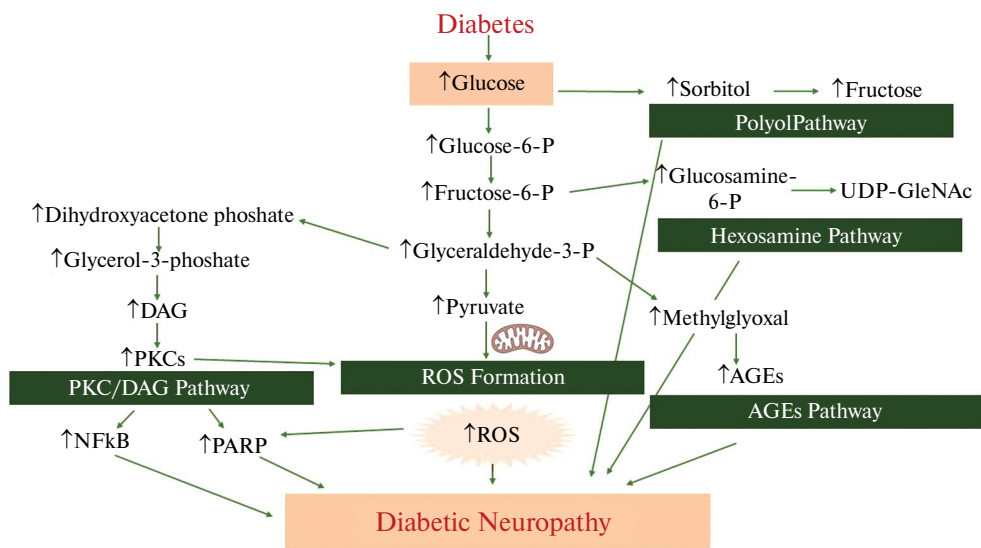


Рис. 1. Основные метаболические пути, активируемые при гипергликемии и приводящие к развитию диабетической нейропатии. Условные обозначения: АФК – активные формы кислорода, DAG – диацилглицерол, AGE-продукты – конечные продукты глубокого гликирования, NF-κB – транскрипционный ядерный фактор каппа-В, PARP – поли(АДФ-рибозо)-полимераза, UDP-GlcNAc – уридин-дифосфат-N-ацетилглюкозамин.

Таким образом, вызванная СД стойкая гипергликемия обладает как прямым токсическим эффектом, индуцируя через реакции гликирования образование AGE-продуктов, так и опосредованным – через запуск полиолового, гексозаминового путей, индуцируя образование АФК, окислительного стресса, активацию ПКCs, специфического белка 1 (Sp1), ERK1/2, транскрипционного фактора NF-κB, поли(АДФ-рибозо)-полимеразы (PARP) и HIF-1α. Все это потенцирует активацию воспаления и запуск клеточной гибели.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРГЛИКЕМИИ НА КЛЕТКИ ЦНС

Устойчивые эпизоды гипергликемии приводят к нарушению деятельности нейронов, вызывая их гибель. В то же время нейроглия реагирует на повышенный уровень глюкозы преимущественно по провоспалительному типу, запуская высвобождение цитокинов, которые в свою очередь оказывают токсический эффект на нейроны и способствуют дальнейшей активации глии. Астроциты как клетки, принимающие непосредственное участие в функционировании нейронов, являются основными посредниками негативного влияния гипергликемии на нейроны. Микроглия, вероятно, отвечает при СД за распространение нейровоспаления в мозговой ткани, потенцируя негативное действие гипергликемии системно на все структуры и клетки головного мозга.

Влияние гипергликемии на нейроны

Гипергликемия, сопровождающая СД, в первую очередь влияет на клетки, которые имеют ограниченную способность регулировать потребление глюкозы. К таким клеткам, помимо эндотелиальных клеток капилляров сетчатки, мезэнгиальных клеток почечных клубочков, шванновских клеток, относятся и нейроны [3].

Методом магнитно-резонансной томографии показано, что длительная гипергликемия приводит к структурным изменениям в головном мозге. Нарушение работы нервной системы у пациентов с СД связано с развитием макро- и микроангиопатии, очагов нейродегенерации из-за ишемических эпизодов и резких колебаний уровня глюкозы [25]. В конечном счете в нейронах накапливаются метаболические изменения: усиливается митохондриальная дисфункция и развивается окислительный стресс, сопряженный с усиленным образованием свободных радикалов и снижением возможности их нейтрализации [25, 26] и запуску воспалительного ответа [27–29]. Запуск основных метаболических путей, активирующихся при гипергликемии: полиолового, диацилглицеролового, гексозаминового, активация митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и NF- κ B, а также образование АФК – приводят к активации гибели нейронов и нейровоспалению [2, 4].

В условиях высокого уровня глюкозы происходят реакции гликирования аминокислот и образования AGE-продуктов, которые через собственные рецепторы RAGE вызывают избыточное производство АФК в нейронах. Это нарушает правильную упаковку белков, в том числе в митохондриях. Митохондриальная дисфункция ведет как к накоплению АФК, так и снижению синтеза АТФ, что нарушает регуляцию ионного баланса в нейронах, приводит к деполяризации плазматической мембраны, высвобождению медиаторов и гиперактивации постсинаптических рецепторов – развитию эксайтотоксичности и гибели нервных клеток [30]. Исследования показали, что АФК и возникающий в результате окислительный стресс играют ключевую роль в апоптозе нервных клеток [31, 32]. К группе АФК относят свободные радикалы: супероксидный анион (O_2^-), гидроксильные радикалы и перекись водорода – молекулы со сверхкоротким периодом жизни из-за их высокой химической активности и способностью нарушать структуру ДНК, белков и липидов. В норме клетка обладает различными механизмами антиоксидантной защиты, однако при избыточном образовании АФК развивается окислительный стресс, который дополнительно потенцирует образование АФК [33], вызывает мутацию митохондриальной ДНК, нарушение кальциевого гомеостаза нейронов, что может усиливать высвобождение медиаторов, а также стимулировать Ca^{2+} -зависимый путь активации апоптоза клеток [30]. Высокий уровень глюкозы повышал также чувствительность культуры корковых нейронов к глутаматной эксайтотоксичности. Наблюдалось значительное увеличение уровней белка субъединиц GluA1 и GluA2 AMPA-рецептора, что влияло на чувствительность нейронов к AMPA- или NMDA-индуцированной нейротоксичности, а также снижало внеклеточный уровень глутамата в первичной культуре нейронов коры [34]. Таким образом, глюкозотоксичность для

нейронов может быть также опосредована нарушением гомеостаза глутамата [34]. Кроме того, культивирование первичных нейронов гиппокампа в среде с высоким содержанием глюкозы (30 мМ) показало увеличение экспрессии белка циклинзависимой киназы Cdk5 и ее активности вплоть до аберрантной, что приводило к апоптозу нейронов гиппокампа через активацию каскада MKK6/p38 MAPK [35].

Нейрокогнитивные изменения, наблюдаемые у пациентов с СД, связанные с изменениями объема белого и серого вещества, особенно заметны у пациентов с длительной гипергликемией или повторяющимися эпизодами тяжелой гипергликемии. Исследования показали снижение объема серого вещества таламуса, височных долей, парагиппокампальной извилины, островковой коры и угловой извилины – областей мозга, связанных с памятью, вниманием и речевой функцией [36, 37]. При обоих типах СД наблюдается снижение синаптической пластичности гиппокампа, аномальная экспрессия нейропептидов в нейронах гипоталамуса, нейротоксичность и изменения в нейротрансмиссии глутамата, увеличение уровня циркулирующего кортикостерона, повышенная чувствительность к стрессу и снижение регуляции глюкокортикоидных рецепторов гиппокампа, что может способствовать развитию морфофункциональных нарушений в ЦНС.

Энцефалопатия, характеризующаяся приобретенными когнитивными и поведенческими нарушениями, является одним из осложнений СД [38]. Одним из наиболее чувствительных к метаболическим нарушениям при СД участком мозга является гиппокамп [39–41]. Гиппокамп является частью лимбической системы, которая особенно чувствительна к повышенному уровню сахара в крови, вовлечена в процессы формирования памяти, эмоций и адаптивных реакций [42, 43]. Молекулярные и структурные изменения в гиппокампе при СД сопровождаются снижением памяти и обучения [44]. В модели стрептозотоцин-индуцированной гипергликемии на мышах были продемонстрированы нарушения памяти, связанные с молекулярными изменениями в гиппокампе, включая снижение количества субъединиц GluN1 и GluN2a рецептора NMDA, снижение уровня фосфорилирования транскрипционного фактора CREB, связанного с памятью, и снижение экспрессии генов, кодирующих белки SYT2, SYT4 и BDNF, регулирующих синаптическую передачу и пластичность [45].

Процессы ассоциативного обучения, приобретения и извлечения памяти связаны с долгосрочными изменениями в синаптической передаче между нейронами гиппокампа. При СД происходят изменения пре- и постсинаптических структур нейронов гиппокампа. Так, нейроны в СА3 области гиппокампа подвергаются ультраструктурным изменениям, включающим сокращение и упрощение их апикальных дендритов и уменьшение количества везикул в пресинаптических окончаниях [46]. Влияние гипергликемии на синтез и высвобождение ключевых нейромедиаторов объясняет развитие когнитивного дефицита, наблюдаемого у животных с СД [47, 48]. Так, в модели СД 1-го типа наблюдали повышенный уровень дофамина в различных областях мозга, снижение базального уровня серотонина и дофамина в гиппокампе [49], а также снижение базального уровня глутамата в зубчатой извилине [50]. При хронической гипергликемии внеклеточные уровни ГАМК и глутамата в мозге снижаются [51], а возникающий дисбаланс между возбуждающими и тормозными медиаторами может являться пусковым фактором развития нейродегенерации и, следовательно, когнитивных нарушений.

Таким образом, длительная гипергликемия ответственна как за структурные нарушения нервных клеток вплоть до их гибели, развитие дисбаланса нейромедиаторов, так и за нарушение функциональной активности нейронов, проявляющиеся в том числе и когнитивным дефицитом у пациентов с СД. Изучение механизмов, ответственных за гибель и нарушение работы нейронов, а также поиск препаратов, корректирующих нарастающую нейронную дисфункцию, могут снизить негативные влияния высокого уровня глюкозы на качество жизни пациентов с СД [52, 53].

Влияние гипергликемии на микроглию

Микроглия представляет собой резидентные иммунные клетки в ЦНС, которые в норме участвуют как в процессе формирования мозга, так и в поддержании гомеостаза нервной ткани во взрослом состоянии, а при патологии – в реализации нейровоспаления как ответной реакции ткани на повреждение [54–56]. Выполняя функцию макрофагов, микроглия отвечает за уничтожение микробов, мертвых клеток, избыточных синапсов, белковых агрегатов и других антигенов, которые могут представлять опасность для ЦНС, однако активность микроглии жестко регулируется ее микроокружением [55].

В норме микроглиальные клетки «мониторят» гомеостаз нервной ткани, перемещаются по ней и с помощью отростков «ощупывают» другие клетки и окружающее пространство в поисках сигнальных молекул повреждения [57]. Воздействие повреждающего фактора активирует микроглию. Активированная микроглия усиленно пролиферирует, а форма ее клеток становится амебоидной с толстыми и короткими отростками. Кроме того, усиливаются миграционные свойства микроглии, меняется ее секреторный профиль и усиливается фагоцитарная активность [57]. По функциональному состоянию активированную микроглию традиционно классифицируют на два полярных типа: нейротоксический M1-фенотип и нейропротекторный M2-фенотип – хотя предполагается, что существует множество промежуточных типов активированной микроглии [58]. Функциональный фенотип микроглии определяется сигналами микроокружения, в том числе медиаторами нервных и астроглиальных клеток, которые также реагируют на уровень повреждения, степень дисфункции, стадию воспалительного ответа ткани. Изменение функциональной активности микроглии также может быть связано с процессами старения мозга и развитием нейродегенерации, наблюдаемой при хронической гипергликемии и СД. Таким образом, являясь источником большого количества сигнальных соединений, микроглия может индуцировать или модулировать широкий спектр клеточных реакций [55, 56, 58].

Изменение функционального фенотипа микроглии тесно связано и с изменением ее метаболической активности. В качестве метаболических путей образования энергии наивная микроглия использует как гликолиз, так и окислительное фосфорилирование. Микроглия экспрессирует широкий набор переносчиков глюкозы на своей мембране: обнаружены мРНК и белки GLUT1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12 и 13 – однако при провоспалительной стимуляции резко возрастает экспрессия именно GLUT1 [59]. Так, показано, что активированная липополисахаридом и $\text{INF}\gamma$ микроглия приобретает M1-фенотип и демонстрирует высокий уровень экспрессии GLUT1, что свидетельствует о метаболическом перепрограммировании клеток в сторону анаэробного гликолиза [59]. Блокировка GLUT1 активированной микроглии существенно подавляла ее фагоцитарную активность, что прямо влияло на функциональную активность клеток. Предполагается, что в условиях острого недостатка O_2 наблюдается гибель нейронов и астроцитов, тогда как микроглия еще сохраняет жизнеспособность – приобретает провоспалительный фенотип, переходит на гликолиз, зачищает от детрита и погибших клеток зону нейровоспаления. Степень активации микроглии определяется уровнем потребления энергетических субстратов: глюкозы, жирных кислот, глутамина, доступность которых существенно изменяется при СД. Учитывая, что СД и гипергликемия сопровождаются нарушением усвоения энергетических субстратов клетками, а также нарушением функции микрососудистого русла, то микроглия в отсутствие повреждающего фактора уже оказывается в условиях, способствующих трансформации в провоспалительный фенотип. Показано, что микроглия стимулированная IL-4 в M2-фенотип снижает потребление глюкозы и выработку лактата, что свидетельствует о снижении потребности в анаболических реакциях микроглии [60]. Интересно, что глюкоза является не только метаболическим субстратом для клеток, но и опосредует сигнальную функцию, например, влияет на продукцию провоспалительных факторов. Так, продукция оксида

азота (NO) микроглией сопряжена с потреблением НАДФН, который регенерируется из НАДФ⁺ прежде всего через гексозомонофосфатный шунт, использующий в качестве субстрата только глюкозу. Доступность глюкозы определяет интенсивность глиальной продукции NO, который реализует как адаптивные, так и патогенетические эффекты в очаге воспаления [61]. Таким образом, последствия метаболических нарушений, вызванные гипергликемией при СД, в ткани мозга могут влиять на запуск этапов воспалительного ответа.

Высокий уровень глюкозы оказывает негативное влияние на пролиферацию микроглиальных клеток [62], а также вызывает активацию микроглии [12, 63]. В условиях СД и хронической гипергликемии активность нейронов также существенно изменяется, в результате чего они выделяют стимуляторы микроглии [57]. Показано, что 24-часовое культивирование микроглии в среде с высоким содержанием глюкозы оказывает цитотоксический эффект за счет активации каспазы-1 и индукции апоптоза [64, 65]. Более длительная инкубация (12 суток) клеток микроглии человека в среде с высоким уровнем глюкозы вызывала изменения фенотипов микроглии, опосредуемых через ERK5-зависимый путь [66]. Одновременно с морфологическими изменениями микроглии в данных условиях происходит активация клеток, на что указывает экспрессия специфических маркеров, таких как Iba1 (Ionized calcium-binding adaptor molecule 1) и рецепторов CD11b, CD68 и MHC-II. Исследования *in vitro* показали, что высокие концентрации глюкозы (35 mM) активируют микроглию и стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1), регулятор пролиферации микроглии M-CSF [67]. Инкубация микроглиальных клеток мыши BV2 в среде, имитирующей гипергликемию при СД, вызывает их активацию: усиленное образование АФК и синтез провоспалительных цитокинов и NO через активацию сигнальных путей p38 и JNK [68].

Гиперактивация микроглии в условиях гипергликемии проявляется увеличением экспрессии НАДФН-оксидазы, которая генерирует супероксидный анион и АФК [55], что в конечном счете проявляется увеличением продукции АФК и AGE-продуктов. M-1 микроглия экспрессирует также iNOS, синтезирующую NO [55]. Последний в присутствии супероксидного аниона может превращаться в пероксинитрит и дополнительно повреждать клетки, кроме того, NO потенцирует токсическое действие глутамата, тем самым усиливая нейротоксичность через NMDA-рецепторы [55]. Другим важным медиатором воспаления, продуцируемым M1-фенотипом микроглии, является матриксная металлопептидаза 12, способная повреждать матрикс нервной ткани [55].

АФК индуцируют дополнительную активацию микроглии через пути NF- κ B и фосфорилирование внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (ERK), в результате чего повышается секреция ими провоспалительных цитокинов. Показано, что модуляция активности микроглии при диабетической энцефалопатии может включать различные сигнальные пути, в том числе формирование инфламасомы NLRP3, путь NF- κ B, фракталкин/CX3CR1-путь, p38 MAPK, CD200/CD200R, AGEs/RAGE и Akt/mTOR и активацию пуринергической системы мозга [63, 67].

Важным фактором, активирующим микроглию, является АТФ, высвобождаемый из поврежденных клеток. Под действием АТФ через P2RY12 происходит функциональная трансформация микроглиальных клеток, приводящая к усилению миграционной активности клеток в направлении зоны повреждения [57]. Показано, что отдельные функции активированной микроглии также опосредованы активацией пуринергических рецепторов: фагоцитоз (P2RY6), пиноцитоз (P2RY4) или секреторную активность (P2RX4 и 7) [57]. Высокий уровень глюкозы вызывает транзитное увеличение уровня внутриклеточного Ca²⁺ в микроглии за счет активации пуринергических рецепторов: через P2X, обеспечивая транспорт Ca²⁺ из интерстиция, а через P2Y2 – меньшее высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо [69] и гиперэкспрессию механочувствительного катионного канала Piezo1 [63]. Последний увеличивает как приток Ca²⁺ из

окружающей среды, так и повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле за счет активации метаболитных пуринергических рецепторов P2Y [63]. Следовательно, метаболические нарушения в нервной ткани и изменение баланса продукции АТФ может существенно изменить пуринергическую регуляцию функций, в том числе и микроглиальных клеток.

Таким образом, развитие СД и связанные с ним метаболические нарушения оказывают широкий спектр влияний на функционирование микроглии. Так, на фоне гипергликемии происходят морфофункциональные изменения в микроглии и модификация секреторного фенотипа в сторону продукции провоспалительных факторов, что меняет адаптационный потенциал клеток и снижает устойчивость гомеостаза в ЦНС. Понимание механизмов активации и взаимодействия между глиальными клетками, формирование ими сигнального микроокружения нейронов может играть важную роль в понимании прогрессирования заболеваний и разработки методов их лечения [54, 58]. Поэтому поиск модуляторов функционального состояния микроглии может помочь в разработке новых методов коррекции нейропатии при СД.

Влияние гипергликемии на астроциты

Астроциты – наиболее распространенные глиальные клетки в мозге, которые отвечают за гомеостаз нейромедиаторов и ионный баланс, защиту от окислительного стресса и репарацию ткани, регуляцию работы синапсов и синаптогенеза [70, 71]. Астроциты являются структурными элементами гематоэнцефалического барьера, а значит, выполняют важную для мозга барьерную функцию [30, 72, 73]. Кроме того, астроциты, выступая в качестве депо гликогена, являются «энергетическими станциями» нервной ткани и «аварийным резервом» энергетических субстратов в условиях патологического процесса в ЦНС, например, при ишемии. Они поглощают питательные вещества из крови, метаболизируют их и доставляют в активно работающие синапсы для поддержания функций нейронов [72, 74]. Астроциты за счет множества плотных контактов образуют синцитий, посредством которого происходит распространение «кальциевых волн», что указывает на возможность передачи сигналов в мозге нейрон-независимым образом [75].

Особенности морфологии и локализации астроцитов позволяют им реагировать на изменения микроокружения и взаимодействовать с нейронами, обеспечивая их функционирование при разной степени активации [70, 71]. В головном мозге глюкоза поступает в астроциты через переносчик GLUT1 и либо участвует в гликолизе, либо запасается в форме гликогена [70, 76, 77]. Низкая активность прогликолитического фермента 6-фосфофруктокиназы-2,6-бисфосфатазы-3 (PFKFB3) в нейронах способствует окислению глюкозо-6-фосфата по пентозофосфатному пути, что способствует антиоксидантной защите [74]. А высокая активность PFKFB3 в астроцитах позволяет производить и высвобождать лактат, который поглощается нейронами, использующими его в качестве окисляемого субстрата [74]. Гликолиз в астроцитах активируется в соответствии с возбуждением нейронов и приводит к увеличению высвобождения лактата из астроцитов [78]. Помимо обеспечения лактата, астроцитарный гликолиз играет важную роль в нейропротекции. Среди второстепенных путей метаболизма глюкозы интерес исследователей привлекает поток глюкозы к пентозофосфатному пути, основному шунтирующему пути гликолиза. Фактически активность пентозофосфатного пути в астроцитах в пять-семь раз выше, чем в нейронах. Астроцитарный пентозофосфатный путь играет ключевую роль в защите нейронов от окислительного стресса, обеспечивая нейроны восстановленной формой глутатиона, который необходим для устранения АФК [78].

Между астроцитами и нейронами обнаружена метаболическая система взаимодействия, называемая астроцит-нейронным лактатным челноком или шаттлом (ANLS). В условиях избытка глюкозы астроциты активно ее поглощают и пополняют запасы гликогена, а при ее недостатке запасы гликогена быстро истощаются [77]. Быстрое рас-

щепление гликогена с образованием лактата и функционирование ANLS необходимо при повышенной активности нейронов, а также в условиях низкого уровня глюкозы [77]. Астроциты, таким образом, выступают в роли депо энергетических субстратов для обеспечения потребностей нейронов [71, 76].

О важности метаболической функции астроцитов в мозге свидетельствуют данные электронной микроскопии у мышей с СД, где установлено изменение морфологии астроцитов, включенных в нейроваскулярную единицу мелких сосудов мозга [79]. В экспериментах *in vitro* на клетках, культивируемых в среде с высоким содержанием глюкозы, и на срезах мозга крыс с СД показано, что эти факторы снижают взаимодействие между астроцитами через щелевые контакты [80]. *In vitro* высокие уровни глюкозы (30 ммоль/л) приводили к изменениям в морфологии астроцитов и экспрессии белков цитоскелета, таких как GFAP и виментин. Уровни IL-6, IL-1 β , IL-4, TNF- α и VEGF повышались, тогда как уровень трансформирующего фактора роста- β оставался неизменным [81]. Состояние астроцитов решающим образом определяет целостность и функциональное состояние гематоэнцефалического барьера: изменение реактивности астроцитов опосредует проницаемость этого барьера и влияет на переход острых состояний головного мозга в хронические [72, 82].

В экспериментах показано, что высокий уровень глюкозы увеличивает продукцию АФК, экспрессию провоспалительных цитокинов и клеточный апоптоз в первичных культурах астроцитов [81, 83, 84], что способствует развитию хронического нейровоспаления и прогрессии диабетической церебральной нейропатии. Хроническая гипергликемия вызывает изменения секреции VEGF, влияя на миграцию, пролиферацию и ангиогенез эндотелиальных клеток, изменяя барьерные функции сосудистой стенки. Нарушение функции гематоэнцефалического барьера на фоне гипергликемии при СД связано с усилением дыхания в перичитах и астроцитах, в результате чего развивается окислительный стресс и активируется продукция АФК [85]. Важно отметить, что дыхательная цепь митохондрий собрана в нейронах плотнее, чем в астроцитах, поэтому биоэнергетическая эффективность митохондрий выше в нейронах, а производство АФК митохондриальным комплексом I очень высоко в астроцитах [74]. В свою очередь АФК стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов, активацию транскрипционного фактора NF- κ B, что дополнительно способствует увеличению проницаемости гематоэнцефалического барьера [30]. В результате помимо стимуляции воспалительного ответа происходит облегчение поступления высокой концентрации глюкозы в ЦНС [30]. Одним из ключевых факторов астроцитарного «секретомы» является фактор VEGF, способствующий снижению барьерных функций гематоэнцефалического барьера, поскольку новообразованные кровеносные сосуды обладают повышенной проницаемостью [73]. В условиях высокого содержания глюкозы происходит снижение астроцитарной экспрессии и продукции коннексина Sx43 и увеличение секреции VEGF, что показано для коры головного мозга крысы [73].

Важной физиологической функцией астроцитов является регуляция ионного гомеостаза, в частности, уровня внеклеточного K⁺ [86]. Накопление K⁺ во внеклеточном пространстве может привести к устойчивой деполяризации и повышенной возбудимости нейронов. В свою очередь астроциты могут либо поглощать избыточный K⁺ с помощью Na⁺/K⁺-насоса, Na⁺/K⁺/Cl⁻-котранспортера или Kir4.1, калиевых каналов входящего выпрямления, либо удаления избытка K⁺ через плотные контакты, образованные коннексинами Sx43 и Sx30 [86]. Гипергликемия при СД способствует снижению продукции коннексина Sx43, что снижает возможности астроцитов поддерживать ионный гомеостаз микроокружения нейронов [73].

Другой важной функцией, в которой участвуют астроциты, является регуляция объема внеклеточного пространства и осмолярности жидкости посредством аквапорина 4 (AQP4), канала, опосредующего трансмембранные перемещения воды в зависимости от осмотических градиентов, и экспрессируемого астроцитами в основном в перисинап-

тических контактах и периваскулярных астроцитарных ножках [86]. Регуляция потока воды вблизи синапсов и кровеносных сосудов может быть связана с гомеостазом K^+ .

Астроциты, кроме того, контролируют концентрацию медиаторов в синаптической щели, влияя на баланс процессов возбуждения и торможения, а также выполняют буферную функцию в отношении нейромедиаторов за счет работы метаболического цикла синтеза глутамин-глутамат-ГАМК [86].

В многочисленных экспериментах по моделированию СД показано, что гипергликемия пагубно сказывается на функционировании астроцитов. Так, в экспериментах на астроцитах, выделенных из мозга новорожденных крыс, показано, что культивирование в среде с высоким уровнем глюкозы (25 мМ) вызывает повышение поглощения аналога глюкозы и не влияет на экспрессию GLUT1 на мембране [76]. В среде с высоким содержанием глюкозы метаболизм астроцитов изменяется в сторону увеличения запасов гликогена [76]. Но вместе с тем для «гипергликемических» астроцитов показано снижение метаболической эффективности и емкости клеток: высокий уровень глюкозы снижал уровень максимального дыхания астроцитов и их гликолитическую резервную способность, оцениваемую с помощью митохондриального стресс-теста Seahorse и гликолитического стресс-теста [76]. Таким образом, астроциты, культивируемые в растворе с высоким содержанием глюкозы, оказываются более уязвимы к периодам депривации глюкозы [76]. Кроме того, высокий уровень глюкозы оказывает негативные осмотические эффекты на работу нервной ткани. Показано, что воздействие высокого уровня глюкозы увеличивает содержание и активность $Na^+/K^+/Cl^-$ котранспортера и Na^+/H^+ -обменника 1 в клетках гематоэнцефалического барьера, что в случае ишемических событий на фоне гипергликемии будет усиливать формирование отека, транспорт ионов и воды и вызывать набухание астроцитов [87].

В экспериментах *in vitro* высокий уровень глюкозы (25 мМ) вызывал остановку клеточного цикла первичных астроцитов: было показано снижение экспрессии циклинов D1 и D3, а также ингибирование пролиферации и миграции первичных астроцитов [88]. Высокий уровень глюкозы усиливал гликолитический метаболизм, повышал содержание АТФ и гликогена в первичных астроцитах [88]. Кроме того, высокий уровень глюкозы активизирует сигнальный путь АМР-активируемой протеинкиназы (АМРК) в астроцитах [88]. Таким образом, гипергликемия оказывает влияние на энергетический метаболизм и функциональный фенотип астроцитов, что может являться потенциальным механизмом, лежащим в основе развития диабетической церебральной нейропатии.

Астроциты и нейроны различаются по регуляции гликолитических ферментов и по организации их митохондриальной дыхательной цепи [89]. Образующиеся в митохондриях астроцитов АФК регулируют утилизацию глюкозы через пентозофосфатный путь и метаболизм глутатиона, который модулирует окислительно-восстановительный статус и, возможно, определяет выживаемость нейронов [89]. Кроме того, астроциты играют важную роль в защите нейронов от эксайтотоксичности, поскольку способны поглощать глутамат и выступать в качестве депо ионов K^+ , поступающих в клетку через $Kir4.1$, калиевые каналы входящего выпрямления [90]. Культивирование астроцитов условиях гипергликемии ведет к снижению содержания белков калиевых каналов $Kir4.1$ и нарушению поглощения калия и глутамата [68]. Кроме того, показано, что экспрессируемая астроцитами miR-205, уровень которой возрастает в 6 раз при инкубации с высоким уровнем глюкозы по сравнению с нормой, угнетает экспрессию мРНК $Kir4.1$ [90].

На вовлеченность астроцитов в нейровоспаление и способность влиять на другие клетки головного мозга указывают результаты немногочисленных исследований. Так, в работе Nardin с соавт. на гипергликемических крысах показано снижение экспрессии S100B, Ca^{2+} -связывающего белка астроцитов, регулирующего образование цитоскелета и клеточный цикл [91]. Увеличение внеклеточного уровня S100B является маркером активации глии при состояниях, связанных с повреждением головного мозга: считается, что в зависимости от концентрации S100B оказывает трофическое или апоптоти-

ческое действие на нейроны. Другим показателем изменения активности астроцитов в условиях высокого уровня глюкозы в среде является пониженное содержание глиального фибриллярного кислого белка и глутатиона, снижение скорости пролиферации клеток. В свою очередь такие изменения активности астроцитов могут влиять и на выживание нейронов, что отчасти объясняет развитие когнитивного дефицита и других нарушений работы нервной системы, наблюдаемых у пациентов с СД [91]. Ранние работы Kelleher с соавт. продемонстрировали, что астроциты могут выполнять защитную роль при инкубации в среде с высоким содержанием глюкозы (15–30 ммоль/л) за счет выделения в окружающую среду фермента лактатдегидрогеназы, это позволяет утилизировать избыточную глюкозу и синтезировать АТФ [92].

Поскольку астроциты выступают источником метаболических субстратов и АТФ, в том числе в области синаптических контактов, а функциональная активность этих глиальных клеток также нарушается в условиях развития гипергликемии, то важно понимать, какую роль они играют в обеспечении проводниковой функции нейронов и работе синапсов в ЦНС.

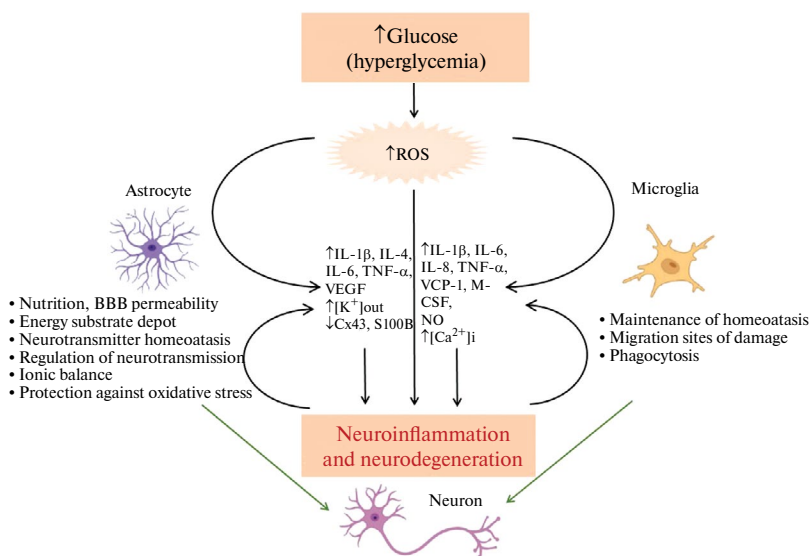


Рис. 2. Влияние гипергликемии на взаимодействие нейронов, астроцитов и микроглии, приводящее к нейровоспалению и нейродегенерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гипергликемия, сопровождающая развитие СД, нарушает трофическую функцию кровеносных сосудов, в том числе церебральных, меняет гемостазический баланс крови, а также является основным повреждающим фактором, запускающим гибель нервных клеток, повышая реактивность глии (рис. 2). Адаптивное изменение деятельности астроцитов на молекулярном, клеточном и функциональном уровнях, так называемый астроглиоз, направлен на синтез и высвобождение большого количества факторов: нейротрофинов, провоспалительных цитокинов, NO и других сигнальных молекул, имеющих как адаптивное, так и патогенетическое значение для выживаемости нейронов и регуляции активности микроглии. В условиях высокой концентрации глюкозы микроглия также

приобретает реактивный фенотип и продуцирует широкий спектр провоспалительных факторов, что дополнительно усиливает нейровоспаление, вовлекая все большее число глиальных клеток в продукцию провоспалительных и нейротоксических факторов, вызывающих нейрональную дисфункцию. Нарушение метаболизма глюкозы ведет к изменению баланса АТФ, аденозина и других нуклеотидов, которые через пуринергические рецепторы нейронов, астроцитов и клеток микроглии усиливают развитие нейровоспаления и дальнейшее поражение головного мозга. Поэтому исследование влияния гипергликемии и роли астроцитов и микроглии в патогенезе нейровоспаления и нейродегенерации, изучение взаимодействия между глиальными клетками и нейронами является актуальной и важной задачей фундаментальной физиологии и медицины. Поиск ключевых путей активации астроцитов и микроглии, способов модуляции их функциональной активности и коррекции последствий метаболических нарушений, вызванных гипергликемией, могут рассматриваться в качестве основных терапевтических стратегий, направленных на эффективное купирование и снижение тяжести последствий поражений мозга в результате ишемии, травмы или нейродегенеративных заболеваний.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея написания обзора (М. П. М.), поиск и анализ литературных источников на тему обзора (М. П. М., И. Г. С., Л. Р. Г.), написание и редактирование манускрипта (М. П. М., И. Г. С., Л. Р. Г.), окончательный дизайн и одобрение финальной версии (М. П. М. и Л. Р. Г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Института физиологии Российского национального исследовательского университета им. Н. И. Пирогова и Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. 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. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Майоров АЮ, Мокрышева НГ, Андреева ЕН, Безлепкина ОБ, Петеркова ВА, Артемова ЕВ, Бардюгов ПС, Бешлиева ДД, Бондаренко ОН, Бурумкулова ФФ, Викулова ОК, Волеводз НН, Галстян ГР, Гомова ИС, Григорян ОР, Джемилова ЗН, Ибрагимов ЛН, Калашиников ВЮ, Кононенко ИВ, Кураева ТЛ, Лаптев ДН, Липатов ДВ, Мельникова ОГ, Михина МС, Мичурова МС, Мотовилин ОГ, Никонова ТВ, Роживанов РВ, Смирнова ОМ, Старостина ЕГ, Суркова ЕВ, Сухарева ОЮ, Тиселько АВ, Токмакова АЮ, Шамхалова МШ, Шестакова ЕА, Ярек-Мартынова ИЯ, Ярославцева МВ (2023) Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. (ред) ИИ Дедов, МВ Шестакова, АЮ Майоров 11-й вып Сахарный диабет 26(2S): 1–157. [Dedov I, Shestakova M, Mayorov A, Mokrysheva N, Andreeva E, Bezlepkin O, Peterkova V, Artemova E, Bardiugov P, Beshlieva D, Bondarenko O, Burumkulova F, Vikulova O, Volevodz N, Galstyan G, Gomova I, Grigoryan O, Dzhemilova Z, Ibragimova L, Kalashnikov V, Kononenko I, Kuraeva T, Laptev D, Lipatov D, Melnikova O, Mikhina M, Michurova M, Motovilina O, Nikonova T, Rozhivanov R, Smirnova O, Starostina E, Surkova E, Sukhareva O, Tiselko A, Tokmakova A, Shamkhalova M, Shestakova E, Jarek-Martynova I, Yaroslavceva M (2023) Standards of Specialized Diabetes Care (Eds) Dedov II, Shestakova MV, Mayorov AYU 11th Edit Diabetes mellitus 26(2S): 1–157. (In Russ)]. <https://doi.org/10.14341/DM13042>

2. Luna R, Talanki Manjunatha R, Bollu B, Jhaveri S, Avanthika C, Reddy N, Saha T, Gandhi F (2021) A Comprehensive Review of Neuronal Changes in Diabetics. *Cureus* 13(10): e19142. <https://doi.org/10.7759/cureus.19142>
3. Rajchgot T, Thomas SC, Wang JC, Ahmadi M, Balood M, Crosson T, Dias JP, Couture R, Claing A, Talbot S (2019) Neurons and Microglia; A Sickly-Sweet Duo in Diabetic Pain Neuropathy. *Front Neurosci* 13: 25. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00025>
4. Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA (2018) Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death Dis* 9(2): 119. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>
5. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813–820. <https://doi.org/10.1038/414813a>
6. Попыхова ЭБ, Степанова ТВ, Лагутина ДД, Кириязи ТС, Иванов АН (2020) Роль сахарного диабета в возникновении и развитии эндотелиальной дисфункции. *Пробл эндокринол* 66(1): 47–55. [Popykhova EB, Stepanova TB, Lagutina DD, Kirijazi TS, Ivanov AN (2020) The role of diabetes mellitus in the occurrence and development of endothelial dysfunction. *Probl Endocrinol* 66(1): 47–55. (In Russ)]. <https://doi.org/10.14341/probl12212>
7. Yan LJ (2014) Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res* 2014: 137919. <https://doi.org/10.1155/2014/137919>
8. Kohnert KD, Freyse EJ, Salzsieder E (2012) Glycaemic variability and pancreatic β -cell dysfunction. *Curr Diabetes Rev* 8(5): 345–354. <https://doi.org/10.2174/157339912802083513>
9. Erekat NS (2022) Programmed Cell Death in Diabetic Nephropathy: A Review of Apoptosis, Autophagy, and Necroptosis. *Med Sci Monit* 28: e937766. <https://doi.org/10.12659/MSM.937766>
10. Shen J, San W, Zheng Y, Zhang S, Cao D, Chen Y, Meng G (2023) Different types of cell death in diabetic endothelial dysfunction. *Biomed Pharmacother* 168: 115802. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115802>
11. Ke D, Zhang Z, Liu J, Chen P, Li J, Sun X, Chu Y, Li L (2023) Ferroptosis, necroptosis and cuproptosis: Novel forms of regulated cell death in diabetic cardiomyopathy. *Front Cardiovasc Med* 10: 1135723. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1135723>
12. Yang L, Tong Y, Chen PF, Miao S, Zhou RY (2020) Neuroprotection of dihydrotestosterone via suppression of the toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B signaling pathway in high glucose-induced BV-2 microglia inflammatory responses. *Neuroreport* 31(2): 139–147. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001385>
13. Zhang T, Ouyang H, Mei X, Lu B, Yu Z, Chen K, Wang Z, Ji L (2019) Erianin alleviates diabetic retinopathy by reducing retinal inflammation initiated by microglial cells *via* inhibiting hyperglycemia-mediated ERK1/2-NF- κ B signaling pathway. *FASEB J* 33(11): 11776–11790. <https://doi.org/10.1096/fj.201802614RRR>
14. Mei X, Zhou L, Zhang T, Lu B, Sheng Y, Ji L (2018) Chlorogenic acid attenuates diabetic retinopathy by reducing VEGF expression and inhibiting VEGF-mediated retinal neoangiogenesis. *Vascul Pharmacol* 101: 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.11.002>
15. Yu Z, Zhang T, Gong C, Sheng Y, Lu B, Zhou L, Ji L, Wang Z (2016) Erianin inhibits high glucose-induced retinal angiogenesis via blocking ERK1/2-regulated HIF-1 α -VEGF/VEGFR2 signaling pathway. *Sci Rep* 6: 34306. <https://doi.org/10.1038/srep34306>
16. Lovestone S, Smith U (2014) Advanced glycation end products, dementia, and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(13): 4743–4744. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402277111>
17. Kaur G, Harris NR (2023) Endothelial glycocalyx in retina, hyperglycemia, and diabetic retinopathy. *Am J Physiol Cell Physiol* 324(5): C1061–C1077. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00188.2022>
18. Ikonomidis I, Pavlidis G, Lambadiari V, Kousathana F, Varoudi M, Spanoudi F, Maratou E, Parissis J, Triantafyllidi H, Dimitriadis G, Lekakis J (2017) Early detection of left ventricular dysfunction in first-degree relatives of diabetic patients by myocardial deformation imaging: The role of endothelial glycocalyx damage. *Int J Cardiol* 233: 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.01.056>

19. *Melani A, Turchi D, Vannucchi MG, Cipriani S, Gianfriddo M, Pedata F* (2005) ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochem Int* 47(6): 442–448.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.05.014>
20. *Sheetz MJ, King GL* (2002) Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 288(20): 2579–2588.
<https://doi.org/10.1001/jama.288.20.2579>
21. *Vlassara H, Striker GE* (2013) Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am* 42(4): 697–719.
<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.07.005>
22. *Obrosova IG, Drel VR, Pacher P, Ilnytska O, Wang ZQ, Stevens MJ, Yorek MA* (2005) Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited. *Diabetes* 54(12): 3435–3441.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.54.12.3435>
23. *Худякова НВ, Иванов НВ, Пчелин ИЮ, Шишкин АН, Ворохобина НВ, Байрашева ВК, Василькова ОН* (2019) Диабетическая нейропатия: молекулярные механизмы развития и возможности патогенетической терапии. *Juvenis scientia* 4: 8–12. [*Khudjakova NV, Ivanov NV, Pchelin IYu, Shishkin AN, Vorokhobina NV, Bairasheva VK, Vasilkova ON* (2019) Diabetic neuropathy: molecular mechanisms of development and possibilities of pathogenetic therapy. *Juvenis scientia* 4: 8–12. (In Russ)].
24. *Sun J, Chen L, Chen R, Lou Q, Wang H* (2021) Poly(ADP-ribose) Polymerase-1: An Update on Its Role in Diabetic Retinopathy. *Discov Med* 32(165): 13–22.
25. *Pignatola FC, Desiderio A, Mirra P, Nigro C, Perruolo G, Ulianich L, Formisano P, Beguinot F, Miele C, Napoli R, Fiory F* (2021). Diabetes and Cognitive Impairment: A Role for Glucotoxicity and Dopaminergic Dysfunction. *Int J Mol Sci* 22(22): 12366.
<https://doi.org/10.3390/ijms222212366>
26. *Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, Shaw JE, Gregg EW* (2019) Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia* 62(1): 3–16.
<https://doi.org/10.1007/s00125-018-4711-2>
27. *Ito F, Sono Y, Ito T* (2019) Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants (Basel)* 8(3): 72.
<https://doi.org/10.3390/antiox8030072>
28. *Kamada H, Yu F, Nito C, Chan PH* (2007) Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats: relation to blood-brain barrier dysfunction. *Stroke* 38(3): 1044–1049.
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000258041.75739.cb>
29. *Muriach M, Flores-Bellver M, Romero FJ, Barcia JM* (2014) Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 102158.
<https://doi.org/10.1155/2014/102158>
30. *Liyanagamage DSNK, Martinus RD* (2020) Role of Mitochondrial Stress Protein HSP60 in Diabetes-Induced Neuroinflammation. *Mediators Inflamm* 2020: 8073516.
<https://doi.org/10.1155/2020/8073516>
31. *Vincent AM, Brownlee M, Russell JW* (2002). Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 959: 368–383.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02108.x>
32. *Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA* (2018) Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death Dis* 9(2): 119.
<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>
33. *Рыбакова ЛЛ, Алексанян ЛР, Капустин СИ, Бессмельцев СС* (2020) Окислительно-антиокислительная система организма человека, роль в развитии патологического процесса и его коррекции. *Вестн гематол* 18(4): 26–37. [*Rybakova LP, Aleksanjan LR, Kapustin SI, Bessmeltsev SS* (2020) The oxidative-antioxidative system of the human body, its role in the development of the pathological process and its correction. *Bull Hematol* 18(4): 26–37. (In Russ)].
34. *Sasaki-Hamada S, Sanai E, Kanemaru M, Kamanaka G, Oka JI* (2022) Long-term exposure to high glucose induces changes in the expression of AMPA receptor subunits and glutamate transmission in primary cultured cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 589: 48–54.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.108>
35. *Li W, Roy Choudhury G, Winters A, Prah J, Lin W, Liu R, Yang SH* (2018) Hyperglycemia Alters Astrocyte Metabolism and Inhibits Astrocyte Proliferation. *Aging Dis* 9(4): 674–684.
<https://doi.org/10.14336/AD.2017.1208>
36. *Seaquist ER* (2010) The final frontier: how does diabetes affect the brain? *Diabetes* 59(1): 4–5.
<https://doi.org/10.2337/db09-1600>

37. Klein JP, Waxman SG (2003) The brain in diabetes: molecular changes in neurons and their implications for end-organ damage. *Lancet Neurol* 2(9): 548–554.
[https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(03\)00503-9](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(03)00503-9)
38. Wang C, Li J, Zhao S, Huang L (2020). Diabetic encephalopathy causes the imbalance of neural activities between hippocampal glutamatergic neurons and GABAergic neurons in mice. *Brain Res* 1742: 146863.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146863>
39. Yonamine CY, Michalani MLE, Moreira RJ, Machado UF (2023) Glucose Transport and Utilization in the Hippocampus: From Neurophysiology to Diabetes-Related Development of Dementia. *Int J Mol Sci* 24(22): 16480.
<https://doi.org/10.3390/ijms242216480>
40. Yun JH, Lee DH, Jeong HS, Kim HS, Ye SK, Cho CH (2021) STAT3 activation in microglia exacerbates hippocampal neuronal apoptosis in diabetic brains. *J Cell Physiol* 236(10): 7058–7070.
<https://doi.org/10.1002/jcp.30373>
41. Deng J, Chen L, Ding K, Wang Y (2021) Acute glucose fluctuation induces inflammation and neurons apoptosis in hippocampal tissues of diabetic rats. *J Cell Biochem* 122(9): 1239–1247.
<https://doi.org/10.1002/jcb.29523>
42. Foghi K, Ahmadpour S (2013). Diabetes mellitus type 1 and neuronal degeneration in ventral and dorsal hippocampus. *Iran J Pathol* 9(1): 33–37.
43. Sadeghi A, Hami J, Razavi S, Esfandiary E, Hejazi (2016) The Effect of Diabetes Mellitus on Apoptosis in Hippocampus: Cellular and Molecular Aspects. *Int J Prev Med* 7: 57.
<https://doi.org/10.4103/2008-7802.178531>
44. Sebastian MJ, Khan SK, Pappachan JM, Jeeyavudeen MS (2023). Diabetes and cognitive function: An evidence-based current perspective. *World J Diabetes* 14(2): 92–109.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v14.i2.92>
45. Ripoli C, Spinelli M, Natale F, Fusco S, Grassi C (2020) Glucose Overload Inhibits Glutamatergic Synaptic Transmission: A Novel Role for CREB-Mediated Regulation of Synaptotagmins 2 and 4. *Front Cell Dev Biol* 8: 810.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00810>
46. Ho N, Sommers MS, Lucki I (2013) Effects of diabetes on hippocampal neurogenesis: links to cognition and depression. *Neurosci Biobehav Rev* 37(8): 1346–1362.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.03.010>
47. Guyot LL, Diaz FG, O'Regan MH, Song D, Phillis JW (2001) The effect of streptozotocin-induced diabetes on the release of excitotoxic and other amino acids from the ischemic rat cerebral cortex. *Neurosurgery* 48(2): 385–391.
<https://doi.org/10.1097/00006123-200102000-00030>
48. Baptista FI, Gaspar JM, Cristóvão A, Santos PF, Köfalvi A, Ambrósio AF (2011) Diabetes induces early transient changes in the content of vesicular transporters and no major effects in neurotransmitter release in hippocampus and retina. *Brain Res* 1383: 257–269.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.071>
49. Ramakrishnan R, Kempuraj D, Prabhakaran K, Jayakumar AR, Devi RS, Suthanthirarajan N, Namasivayam A (2005) A short-term diabetes induced changes of catecholamines and p38-MAPK in discrete areas of rat brain. *Life Sci* 77(15): 1825–1835.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.12.038>
50. Yamato T, Misumi Y, Yamasaki S, Kino M, Aomine M (2004) Diabetes mellitus decreases hippocampal release of neurotransmitters: an in vivo microdialysis study of awake, freely moving rats. *Diabetes Nutr Metab* 17: 128–136.
51. Sherin A, Anu J, Peeyush KT, Smijin S, Anitha M, Roshni BT, Paulose CS (2012) Cholinergic and GABAergic receptor functional deficit in the hippocampus of insulin-induced hypoglycemic and streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience* 202: 69–76.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.058>
52. Liu J, Feng L, Ma D, Zhang M, Gu J, Wang S, Fu Q, Song Y, Lan Z, Qu R, Ma S (2013) Neuroprotective effect of paeonol on cognition deficits of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetic rat. *Neurosci Lett* 549: 63–68.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.06.002>
53. Jing YH, Chen KH, Kuo PC, Pao CC, Chen JK (2013) Neurodegeneration in streptozotocin-induced diabetic rats is attenuated by treatment with resveratrol. *Neuroendocrinology* 98(2): 116–127.
<https://doi.org/10.1159/000350435>
54. Borst K, Dumas AA, Prinz M (2021) Microglia: Immune and non-immune functions. *Immunity* 54(10): 2194–2208.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.09.014>

55. *Colonna M, Butovsky O* (2017) Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35: 441–468.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
56. *Liu Y, Li M, Zhang Z, Ye Y, Zhou J* (2018) Role of microglia-neuron interactions in diabetic encephalopathy. *Ageing Res Rev* 42: 28–39.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.005>
57. *Gómez Morillas A, Besson VC, Lerouet D* (2021) Microglia and Neuroinflammation: What Place for P2RY12? *Int J Mol Sci* 22(4): 1636.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041636>
58. *Kwon HS, Koh SH* (2020) Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9(1): 42.
<https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
59. *Wang L, Pavlou S, Du X, Bhuckory M, Xu H, Chen M* (2019) Glucose transporter 1 critically controls microglial activation through facilitating glycolysis. *Mol Neurodegener* 14(1): 2.
<https://doi.org/10.1186/s13024-019-0305-9>
60. *Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ* (2016) Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 173(4): 649–665.
<https://doi.org/10.1111/bph.13139>
61. *Castillo E, Mocanu E, Uruk G, Swanson RA* (2021) Glucose availability limits microglial nitric oxide production. *J Neurochem* 159(6): 1008–1015.
<https://doi.org/10.1111/jnc.15522>
62. *Baptista FI, Aveleira CA, Castilho ÁF, Ambrósio AF* (2017) Elevated Glucose and Interleukin-1 β Differentially Affect Retinal Microglial Cell Proliferation. *Mediat Inflamm* 2017: 4316316.
<https://doi.org/10.1155/2017/4316316>
63. *Liu H, Bian W, Yang D, Yang M, Luo H* (2021) Inhibiting the Piezo1 channel protects microglia from acute hyperglycaemia damage through the JNK1 and mTOR signalling pathways. *Life Sci* 264: 118667.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118667>
64. *Wang LQ, Zhou HJ* (2018) LncRNA MALAT1 promotes high glucose-induced inflammatory response of microglial cells via provoking MyD88/IRAK1/TRAF6 signaling. *Sci Rep* 8(1): 8346.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-26421-5>
65. *Huang Z, Xie N, Illes P, Di Virgilio F, Ulrich H, Semyanov A, Verkhatsky A, Sperlagh B, Yu SG, Huang C, Tang Y* (2021) From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 6(1): 162.
<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>
66. *Chen C, Wu S, Hong Z, Chen X, Shan X, Fischbach S, Xiao X* (2019) Chronic hyperglycemia regulates microglia polarization through ERK5. *Aging (Albany NY)* 11(2): 697–706.
<https://doi.org/10.18632/aging.101770>
67. *Vargas-Soria M, García-Alloza M, Corraliza-Gómez M* (2023) Effects of diabetes on microglial physiology: a systematic review of in vitro, preclinical and clinical studies. *J Neuroinflamm* 20(1): 57.
<https://doi.org/10.1186/s12974-023-02740-x>
68. *Kongtawelert P, Kaewmool C, Phitak T, Phimphilai M, Pothacharoen P, Shwe TH* (2022) Sesamin protects against neurotoxicity via inhibition of microglial activation under high glucose circumstances through modulating p38 and JNK signaling pathways. *Sci Rep* 12(1): 11296.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-15411-3>
69. *Pereira Tde O, da Costa GN, Santiago AR, Ambrósio AF, dos Santos PF* (2010) High glucose enhances intracellular Ca²⁺ responses triggered by purinergic stimulation in retinal neurons and microglia. *Brain Res* 1316: 129–138.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.12.034>
70. *Chen Z, Yuan Z, Yang S, Zhu Y, Xue M, Zhang J, Leng L* (2023) Brain Energy Metabolism: Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *CNS Neurosci Ther* 29(1): 24–36.
<https://doi.org/10.1111/cns.13982>
71. *Souza DG, Almeida RF, Souza DO, Zimmer ER* (2019) The astrocyte biochemistry. *Semin Cell Dev Biol* 95: 142–150.
<https://doi.org/10.1016/j.semedb.2019.04.002>
72. *Xiong XY, Tang Y, Yang QW* (2022) Metabolic changes favor the activity and heterogeneity of reactive astrocytes. *Trends Endocrinol Metab* 33(6): 390–400.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.03.001>
73. *Garvin J, Semenikhina M, Liu Q, Rarick K, Isaeva E, Levchenko V, Staruschenko A, Palygin O, Harder D, Cohen S* (2022) Astrocytic responses to high glucose impair barrier formation in cerebral microvessel endothelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 322(6): R571–R580.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00315.2020>

74. Almeida A, Jimenez-Blasco D, Bolaños JP (2023) Cross-talk between energy and redox metabolism in astrocyte-neuron functional cooperation. *Essays Biochem* 67(1): 17–26.
<https://doi.org/10.1042/EBC20220075>
75. Verkhratsky A, Nedergaard M (2018) Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* 98(1): 239–389.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
76. Staricha K, Meyers N, Garvin J, Liu Q, Rarick K, Harder D, Cohen S (2020) Effect of high glucose condition on glucose metabolism in primary astrocytes. *Brain Res* 1732: 146702.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146702>
77. Bastian C, Quinn J, Doherty C, Franke C, Faris A, Brunet S, Baltan S (2019) Role of Brain Glycogen During Ischemia, Aging and Cell-to-Cell Interactions. *Adv Neurobiol* 23: 347–361.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-27480-1_12
78. Takahashi S (2021) Neuroprotective Function of High Glycolytic Activity in Astrocytes: Common Roles in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 22(12): 6568.
<https://doi.org/10.3390/ijms22126568>
79. Min LJ, Mogi M, Shudou M, Jing F, Tsukuda K, Ohshima K, Iwanami J, Horiuchi M (2012) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation with angiotensin II type 1 receptor blockade is pivotal for the prevention of blood-brain barrier impairment and cognitive decline in type 2 diabetic mice. *Hypertension* 59(5): 1079–1088.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.192401>
80. Gandhi GK, Ball KK, Cruz NF, Dienel GA (2010) Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. *ASN Neuro* 2(2): e00030.
<https://doi.org/10.1042/AN20090048>
81. Wang J, Li G, Wang Z, Zhang X, Yao L, Wang F, Liu S, Yin J, Ling EA, Wang L, Hao A (2012) High glucose-induced expression of inflammatory cytokines and reactive oxygen species in cultured astrocytes. *Neuroscience* 202: 58–68.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.062>
82. McConnell HL, Li Z, Woltjer RL, Mishra A (2019) Astrocyte dysfunction and neurovascular impairment in neurological disorders: correlation or causation? *Neurochem Int* 128: 70–84.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.04.005>
83. Chistyakov DV, Goriainov SV, Astakhova AA, Sergeeva MG (2021) High Glucose Shifts the Oxylipin Profiles in the Astrocytes towards Pro-Inflammatory States. *Metabolites* 11(5): 311.
<https://doi.org/10.3390/metabo11050311>
84. Abdyeva A, Kurtova E, Savinkova I, Galkov M, Gorbacheva L (2024) Long-Term Exposure of Cultured Astrocytes to High Glucose Impact on Their LPS-Induced Activation. *Int J Mol Sci* 25(2): 1122.
<https://doi.org/10.3390/ijms25021122>
85. Li W, Roy Choudhury G, Winters A, Prah J, Lin W, Liu R, Yang SH (2018) Hyperglycemia Alters Astrocyte Metabolism and Inhibits Astrocyte Proliferation. *Aging Dis* 9(4): 674–684.
<https://doi.org/10.14336/AD.2017.1208>
86. Nikolic L, Nobili P, Shen W, Audinat E (2020) Role of astrocyte purinergic signaling in epilepsy. *Glia* 68(9): 1677–1691.
<https://doi.org/10.1002/glia.23747>
87. Klug NR, Chechneva OV, Hung BY, O'Donnell ME (2021) High glucose-induced effects on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport and Na⁺/H⁺ exchange of blood-brain barrier endothelial cells: involvement of SGK1, PKC β II, and SPAK/OSR1. *Am J Physiol Cell Physiol* 320(4): C619–C634.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00177.2019>
88. Liu W, Zhou Y, Liang R, Zhang Y (2019) Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity alleviates diabetes-related cognitive deficits. *FASEB J* 33(12): 14506–14515.
<https://doi.org/10.1096/fj.201901292R>
89. Vicente-Gutierrez C, Bonora N, Bobo-Jimenez V, Jimenez-Blasco D, Lopez-Fabuel I, Fernandez E, Josephine C, Bonvento G, Enriquez JA, Almeida A, Bolaños JP (2019) Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. *Nat Metab* 1(2): 201–211.
<https://doi.org/10.1038/s42255-018-0031-6>
90. Rivera-Aponte DE, Melnik-Martínez KV, Malpica-Nieves CJ, Tejeda-Bayron F, Méndez-González MP, Skatchkov SN, Eaton MJ (2020) Kir4.1 potassium channel regulation via microRNA-205 in astrocytes exposed to hyperglycemic conditions. *Neuroreport* 31(6): 450–455.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001427>
91. Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Battastini AM, Gottfried C, Gonçalves CA (2007) S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int* 50(5): 774–782.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.01.013>
92. Kelleher JA, Chan PH, Chan TY, Gregory GA (1993) Modification of hypoxia-induced injury in cultured rat astrocytes by high levels of glucose. *Stroke* 24(6): 855–863.
<https://doi.org/10.1161/01.str.24.6.855>

Peculiarities of Brain Cell Functioning During Hyperglycemia and Diabetes Mellitus**M. P. Morozova^{a, *}, I. G. Savinkova^a, and L. R. Gorbacheva^b**^a*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*^b*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*^{*} *e-mail: mormasha@gmail.com*

Hyperglycemia is a symptom and damaging factor of diabetes mellitus (DM) that leads to systemic complications in the body, including macro- and microangiopathies of the brain, impaired blood supply, the appearance of foci of neurodegeneration and might be a trigger of neuroinflammation. Nervous tissue is characterized by a high level of energy consumption and is highly sensitive to fluctuations in the level of metabolic substrates. Therefore, it is extremely important to study the effect of high glucose levels on the functional state of the central nervous system. This review attempts to comprehensively assess the effects of hyperglycemia on brain cells. Analysis of experimental data obtained in *in vivo* and *in vitro* models of diabetes on the morphofunctional state of neurons, microglia and astrocytes showed that the direct and indirect effects of glucose in high concentrations depends on the cell type. Receptors and intracellular signaling cascades of astrocytes and microglia, that mediate the effects of hyperglycemia and the development of neuroinflammation, can act as therapeutic targets for the correction for the consequences of diabetes. Thus, finding ways to modulate the functional activity of glial cells may be an effective strategy to reduce the severity of the consequences of CNS damage.

Keywords: hyperglycemia, astrocytes, microglia, neurons, neurodegeneration, neuroinflammation, diabetes mellitus

ОБЗОРЫ

**ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ КОРТИЗОЛА
И АНТИГЛЮКОКОРТИКОИДНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ АФФЕКТИВНЫХ
РАССТРОЙСТВАХ: ГИППОКАМП КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ**

© 2024 г. Н. В. Гуляева^{1,2}

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

²Научно-практический психоневрологический центр им. З. П. Соловьева Департамента
здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

E-mail: nata_gul@ihna.ru

Поступила в редакцию 26.05.2024 г.

После доработки 12.06.2024 г.

Принята к публикации 13.06.2024 г.

Патофизиология многих аффективных расстройств тесно связана с аномальной реакцией на стресс в результате дисфункции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) и избыточным выбросом кортизола. Гиппокамп, ключевая структура лимбической системы, отвечающая как за когнитивную, так и за эмоциональную сферы, избирательно уязвим к избытку глюкокортикоидов (ГК), вызывающих нейровоспаление и нейродегенерацию. АнтиГК терапия психических заболеваний, в частности, депрессивных расстройств, может стать полезным дополнительным методом лечения. Среди прочих подходов весьма перспективным считается воздействие на глюкокортикоидные рецепторы, плотность которых высока в гиппокампе. Однако несмотря на то, что доклинические данные достаточно убедительно подтверждают концепцию антиГК терапии заболеваний, ассоциированных со стрессом, клинические исследования все еще находятся на стадии доказательства концепции. Примечательно, что хронический избыток ГК ассоциируется не только с аффективными заболеваниями, но и со снижением когнитивных способностей, метаболическими нарушениями, диабетом. Потенциально антиГК терапия (модифицирующая ГГНО) может облегчить аффективные симптомы, когнитивные нарушения, глюкокортикоидную и инсулиновую резистентность, а также побочные эффекты обычных лекарств за счет позитивного влияния на гиппокамп, предотвращая его дисфункцию, нейродегенерацию, нейровоспаление и нарушение нейрогенеза. Поскольку ассоциированная со стрессом/избытком ГК, опосредованная нейровоспалением патология лимбической системы и, в частности, гиппокампа является общим признаком, характерным для многих заболеваний мозга, концепция антиГК терапии может быть развита, проверена и подтверждена на широком спектре церебральных патологий.

Ключевые слова: психические заболевания, гиппокамп, стресс, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, кортизол, депрессия, глюкокортикоиды, антиглюкокортикоидная терапия, глюкокортикоидный рецептор, мифепристон

СОКРАЩЕНИЯ

АКТГ	адренокортикотропный гормон
антиГК	антиглюкокортикоидный
БДР	большое депрессивное расстройство
ГК	глюкокортикоид(ы)
ГР	глюкокортикоидный рецептор
ДРЛ	депрессия, резистентная к лечению
КРГ	кортикотропин-рилизинг-гормон
МР	минералокортикоидный рецептор
DHEA(S)	дигидроэпиандростерон(сульфат)
МГ	мифепристон

ВВЕДЕНИЕ

Как справедливо отметили McEwen и Akil [1], биология стресса – один из наиболее изученных разделов нейронауки, связанный с исследованием аффективных состояний, и идеальная область для решения проблем патофизиологии многих заболеваний, связанных с мозгом. Гиппокамп – структура мозга, необходимая как для реализации эпизодической и декларативной памяти, так и для эмоций, находится на перекрестке реакций организма на стрессовые ситуации. Гиппокамп избирательно уязвим к различным неблагоприятным внешним и внутренним факторам, а дисфункция и атрофия гиппокампа отмечаются в процессе старения и при различных психических и неврологических расстройствах, включая депрессию, шизофрению, биполярное расстройство, посттравматическое стрессовое расстройство, эпилепсию, травмы мозга, когнитивное снижение (например, болезнь Альцгеймера) [2, 3]. Множество исследований свидетельствует о том, что глюкокортикоиды (ГК), исполнительные гормоны связанной со стрессом гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО), являются ключевым фактором, координирующим пластичность гиппокампа и поведение. Тем не менее, многие детали механизмов, связанных с дисфункцией ГГНО при развитии аффективных расстройств, до сих пор остаются неясными, а способы противодействия и смягчения нарушений сигнализации ГК широко не используются в клинике из-за противоречивости имеющихся данных. Целью настоящего обзора является обновление и критическая оценка существующих данных, касающихся избыточной секреции кортизола при аффективных расстройствах, его участия в патогенезе болезни и возможностей антиглюкокортикоидной (антиГК) терапии.

1. СТРЕСС, ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ И ГИППОКАМП

Нормальное функционирование основной нейрогуморальной адаптивной системы организма, эндокринной системы реагирования на стресс, ГГНО заключается в осуществлении выброса ГК (кортизола или кортикостерона) из надпочечников как в соответствии с циркадианным циклом, так и при эпизодической стресс-индуцированной секреции. Выброс ГК из надпочечников, циркадианный и в результате стресса, поддерживает жизнестойкость (способность справляться с угрозами, невзгодами и травмами), являясь необходимым условием гомеостаза организма и адаптации к стрессогенным факторам [4]. Эффекты ГК, клеточно-специфические и контекст-зависимые, форми-

руют ответ индивида на изменение окружающей среды. Специфические рецепторы ГК имеются практически во всех клетках мозга и периферии, что позволяет регулировать метаболические, сердечно-сосудистые, иммунные, нейроэндокринные процессы, а также поведенческую активность. Циркадианное и вызванное острым стрессом повышение уровня ГК – необходимые адаптивные изменения, лежащие в основе выживания нейронов гиппокампа и формирования памяти. В дополнение к доказанному иммуносупрессивному действию ГК, циркадианные повышения ГК потенцируют острые защитные реакции, стимулируя иммунные реакции [5].

У взрослых млекопитающих и человека ГК способствуют устойчивости, в частности, контролируя и координируя основные механизмы нейропластичности гиппокампа, включая глутаматергическую нейротрансмиссию, нейровоспаление, нейротрофические факторы, нейрогенез, функционирование микроглии и астроцитов и т.д. [6, 7]. ГК изменяют нейронную активность, действуя через два специфических типа рецепторов – высокоаффинные минералокортикоидные (МР) и низкоаффинные глюкокортикоидные рецепторы (ГР). И МР, и ГР регулируют транскрипцию генов (действуют как транскрипционные факторы) и могут быстро действовать негеномно, усиливая или подавляя нейронную активность [8–10]. Негеномные быстрые эффекты реализуются за счет активации мембранного пула МР и ГР, в результате которой в течение секунд за счет трансдукции сигналов через эти рецепторы изменяются свойства мембран нейронов. При этом индуцируются изменения свойств синапсов, а также проведения возбуждения. В результате ГК регулируют клеточные функции в различных временных масштабах, от секунд до часов и дней, задействуя мембранные и цитозольные ГР и МР.

По меткому выражению de Kloet [10], функциональный профиль бинарной системы кортикостероидных рецепторов мозга – «посреднический, многозадачный, координирующий, интегрирующий». МР и ГР действуют в скоординированно с нейротрансмиттерными и нейропептидными сигналами, модулируя стрессовые реакции. Баланс сигналов, опосредованных МР и ГР в определенных областях мозга, в основном в лимбической системе, жизненно важен для активности нейронов, стресс-реакции, адаптации и широкого поведенческого программирования. Эта сбалансированная функция МР и ГР может быть изменена эпигенетически, например, в результате травмирующих (ранних) событий в жизни и повторного воздействия стрессоров, а также при наличии предрасполагающих генетических вариантов, влияющих на сигнальные пути этих рецепторов [10]. Нарушенный баланс МР/ГР делает нервную ткань уязвимой к повреждениям; такие повреждения могут негативно влиять на реакцию на стресс и повышать риск развития психопатологии. Считается, что активация МР поддерживает процессы, способствующие выживанию, а чрезмерная активация ГР способствует нейродегенерации, в то время как продолжающаяся совместная активация МР и ГР во время хронического стресса приводит к менее серьезным негативным последствиям [11].

Хотя ГР экспрессируются в каждой клетке нервной системы, уровень их экспрессии варьирует, что позволяет предположить, что различные типы клеток по-разному реагируют на активацию ГР. Стресс/избыток ГК вызывают специфические для каждого типа клеток изменения пластичности в нейронах, Шванновских клетках, микроглии, олигодендроцитах и астроцитах. Пластичность, индуцированная стрессом, может стать дезадаптивной и способствовать развитию нейропсихических расстройств [12]. Механизмы, влияющие на сигнализацию через ГР, многочисленны, и их изучение является одной из горячих точек в трансляционной нейронауке, поскольку нарушение работы ГР может быть существенным звеном в патогенезе практически всех заболеваний мозга. Одним из примеров таких механизмов является фосфорилирование ГР при сигнале BDNF в нейронах мезолимбической (вознаграждение) и кортиколимбической (эмоции) нейронных сетей, лежащих в основе развития дезадаптаций к стрессу [13].

Активность ГГНО регулируется ГК по принципу обратной связи. Отрицательная обратная связь ГК включает в себя различные механизмы, направленные на ограниче-

ние активации ГГНО для предотвращения пагубных последствий избытка ГК. Высвобождение большого количества ГК жестко регулируется сложной нейронной цепью, контролирующей секрецию гипоталамического кортикотропин-рилизинг-гормона (КРГ) и вазопрессина, и таким образом регулирующей адренокортикотропный гормон (АКТГ) гипофиза (рис. 1). Механизмы быстрой обратной связи включают негеномные действия ГК через МР и ГР, опосредующие мгновенное торможение выброса гипоталамического КРГ и гипофизарного АКТГ, а долгосрочные механизмы опосредуются геномными действиями через ГР и включают модуляцию лимбических нейронных цепей и периферических метаболических процессов [5, 8]. ГР через геномные и негеномные механизмы регулируют функцию гипоталамических «стрессовых» нейронов посредством изменения синаптической пластичности, «настройки» внутренней возбудимости и модуляции выработки нейропептидов [14].

2. ДИСФУНКЦИЯ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ ОСИ И ПСИХИЧЕСКИЕ БОЛЕЗНИ. ОБОСНОВАНИЕ РАЗРАБОТКИ АНТИГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

Клетки мозга постоянно подвергаются воздействию ГК, что в нормальных условиях является ключевым условием полноценного стрессового ответа. Однако хронически повышенные уровни ГК, приводящие к устойчивому избытку ГК, оказывают негативное влияние на мозг, в частности, на гиппокамп, где избыток ГК нарушает синаптическую пластичность, вызывая повреждение нейронов, атрофию дендритов, снижение гиппокампального нейрогенеза, гиперглутаматергические состояния и ослабление экспрессии и сигнализации нейротрофического фактора мозга BDNF [7, 16, 18]. С этой точки зрения хронический гиперкортицизм у пациентов с синдромом Кушинга может рассматриваться как экстремальная человеческая модель для изучения влияния избытка кортизола на мозг. При синдроме Кушинга гиперсекреция кортизола ассоциирована с высокой частотой депрессии и тревожности, ухудшением памяти [19]. У таких пациентов наблюдается повреждение гиппокампа (в т. ч. его атрофия), причем функциональные нарушения предшествуют структурным аномалиям (выявляемым методами нейровизуализации), а нормализация уровня кортизола останавливает прогрессирование дисфункции гиппокампа [20].

Известно, что у людей, переживших критическое заболевание, значительно повышен риск развития долгосрочных когнитивных нарушений и психических расстройств [21]. Критическое заболевание сопровождается острым повышением уровня кортизола в крови, который обычно возвращается к норме после выздоровления, однако иногда происходит длительная дисрегуляция ГГНО. Избыток ГК может вызывать долгосрочные изменения адаптивной нейропластичности гиппокампа и префронтальной коры на всех уровнях, от структурной и клеточной пластичности до нейронных сетей. Предполагается, что этот механизм способствует нарушениям аффективной сферы, лежащим в основе психических расстройств [22].

Важно отметить, что у пациентов с нервно-психическими расстройствами (например, расстройствами настроения и шизофренией) наблюдаются все ключевые признаки воспаления, включая повышенный уровень циркулирующих индукторов воспаления, активированных сенсоров и медиаторов воспаления, мишенями которых являются все ткани организма [23]. С точки зрения реакции на стресс, воспаление можно рассматривать как тип аллостатической нагрузки, вовлекающей иммунную, эндокринную и нервную системы [24]. Провоспалительные цитокины модулируют настроение, поведение и когнитивные функции, вызывая нейровоспаление, в частности в гиппокампе и других отдельных лимбических структурах. Нейровоспаление вовлечено в патофизиологию стресс-ассоциированных заболеваний настроения (например,

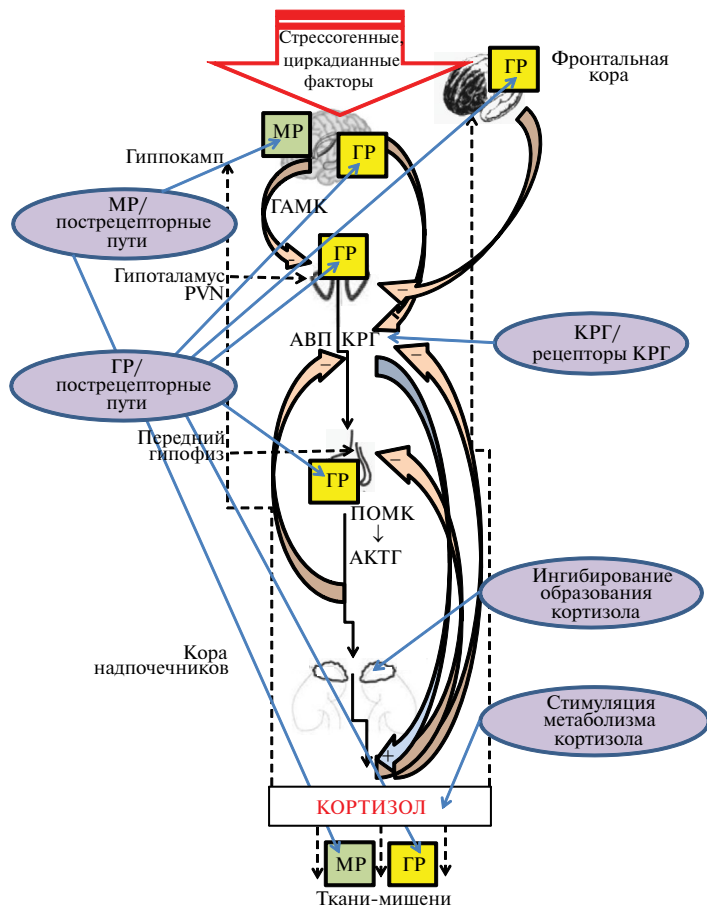


Рис. 1. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось (ГГНО) и потенциальные мишени антиглюкокортикоидной терапии [4, 5, 8, 15–17]. Схематическое изображение показывает каскадную природу оси ГГНО, основной нейроэндокринной оси, лежащей в основе стрессового ответа. Ключевые события этого каскада включают: высвобождение секреторного кортикотропин-рилизинг-гормона (КРГ) и аргинин-вазопрессина (АВП) из медиального парвоцеллюлярного паравентрикулярного ядра (PVN) гипоталамуса в портальную циркуляцию гипофиза; расщепление проопиомеланокортина (ПОМК) до адренокортикотропного гормона (АКТГ) и выброс АКТГ в системную циркуляцию; синтез глюкокортикоидов (ГК) (кортизола у человека или кортикостерона у других видов, включая грызунов) в коре надпочечников и их выброс в системную циркуляцию; связывание глюкокортикоидов (ГК) с глюкокортикоидными рецепторами (ГР) и минералокортикоидными рецепторами (МР) в центральных и периферических тканях-мишенях, включая мозг, после прохождения через гематоэнцефалический барьер, и тем самым осуществление клеточных эффектов ГК. ГР экспрессируются в большинстве структур и областей мозга, связанных с ГГНО, в то время как лимбические структуры, в первую очередь гиппокамп, содержат также МР. Многоуровневые петли обратной связи от гипоталамуса, гипофиза, надпочечников, а также сигналы от гиппокампа и фронтальной коры способствуют регуляции ГГНО, в частности, настраивая циркадианные изменения циркулирующих уровней ГК и снижая их после окончания действия стрессора. Возбуждающий гиппокампальный выход обеспечивает тормозной ГАМКергический вход в PVN, а гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) подавляет секрецию гормонов гипоталамуса. Циркулирующие ГК подавляют секрецию КРГ из гипоталамуса и секрецию АКТГ из гипофиза, а циркулирующий АКТГ также подавляет гипоталамическую секрецию КРГ. Подробное описание потенциальных мишеней антиглюкокортикоидной терапии см. в разделе 2.

большого депрессивного расстройства, БДР) вследствие повышения уровня провоспалительных цитокинов в тканях мозга, активации нейроэндокринных реакций, в частности, ГГНО, повышения устойчивости к ГК, развития эксайтотоксичности, снижения уровня моноаминов в мозге (в частности, влияния на обмен серотонина), влияния на нейрогенез и, таким образом, нарушения всех уровней нейропластичности [7]. Нейровоспаление способствует невосприимчивости к существующим методам лечения, при этом ответ на традиционные антидепрессанты связан со снижением уровня воспалительных биомаркеров, а резистентность к лечению – с усилением воспаления [25]. Как цитокины, так и ГК могут оказывать провоспалительное действие в мозге [26]. Хотя ГК, хорошо известные как противовоспалительные препараты, могут быть нейротективными во время болезни, они также могут усугублять связанное с воспалением повреждение нейронов, а постоянное повышение уровня ГК увеличивает риск развития нейропсихиатрических расстройств. Была предложена гипотеза, описывающая, как в гиппокампе противовоспалительные эффекты ГК могут трансформироваться в провоспалительные [27], однако механизмы такой функциональной трансформации остаются неясными.

В ряде экспериментальных исследований было показано, что лечение соединениями, обладающими антиГК свойствами, может улучшить клеточные эффекты хронического стресса и, таким образом, стать потенциально важным подходом к терапии расстройств, связанных со стрессом [28]. Теоретически, потенциальные мишени для антиГК могут быть представлены на нескольких уровнях: а) гипоталамический уровень: воздействие на КРГ и рецепторы КРГ; б) гипофизарный уровень: воздействие на выработку АКТГ; в) надпочечниковый уровень: воздействие на метаболизм кортизола в надпочечниках; г) рецепторный уровень: воздействие на ГР, МР и соответствующие пострецепторные пути передачи сигнала; д) воздействие на метаболизм кортизола вне надпочечников (рис. 1). Поскольку лимбическая система, контролирующая ГГНО, входит в число тканей-мишеней кортизола, таргетное воздействие на МР и ГР гиппокампа, фронтальной коры и миндалины формирует дополнительный, надгипоталамический уровень регуляции ГГНО.

Согласно имеющимся данным, наиболее перспективные результаты доклинических и/или клинических исследований включают: эффекты антагонистов ГР; экстрагипоталамическое действие КРГ с помощью антагонистов рецепторов КРГ; подавление продукции кортизола в надпочечниках путем блокирования стероид-11-гидроксилазы, превращающей 11-дезоксикортизол в кортизол с помощью метирапона; снижение активности фермента 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы типа 1 (кортизоноредуктазы) с помощью специфических ингибиторов [17].

3. КАКОЙ УРОВЕНЬ КОРТИЗОЛА ЯВЛЯЕТСЯ ПОВЫШЕННЫМ? НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Нарушения регуляции ГГНО и высокий уровень кортизола в крови ассоциированы с различными аффективными расстройствами, а также с нейродегенеративными заболеваниями, эпилепсией и рядом других болезней мозга. Однако обоснованность оценки кортизола как биологического показателя, полезного для лечения заболеваний эмоциональной сферы, до сих пор обсуждается. Это может быть связано с существенными индивидуальными различиями уровня кортизола в норме.

Цель следующих рассуждений – обратить внимание на некоторую неоднозначность определения «высокий уровень кортизола». Нормальные значения кортизола для образца крови, взятого в 8 ч утра, составляют от 5 до 25 мкг/дл или от 140 до 690 нмоль/л [29]. Иными словами, минимальный и максимальный уровни кортизола *в норме* могут различаться в пять раз! Нормальные значения зависят от времени суток, кли-

нического контекста и могут незначительно отличаться в разных лабораториях, однако в любом случае очевидно, что «нормальный» уровень кортизола может значительно различаться у разных людей безотносительно циркадианных изменений. Это может быть менее важно в исследованиях, сравнивающих различные когорты пациентов, попадающих в нормальный интервал уровня кортизола в крови, хотя вариабельность уровня кортизола внутри группы может создать проблему, и поэтому для корректного статистического анализа необходимы более представительные группы. Альтернативой может стать выделение в рамках одной когорты пациентов групп с более высоким или более низким уровнем кортизола в биоматериале и сравнение подгрупп, как это было сделано, например, в исследованиях, изучающих участие кортизола в последствиях очагового повреждения мозга [30–32].

Однако, как только мы переходим от когорт к отдельным пациентам, не имевшим ранее истории измерения уровня кортизола, мы сталкиваемся с трудной проблемой оценки персональной нормы кортизола. Действительно, это важный вопрос, связанный с темой данного обзора, поскольку при аффективных расстройствах эффективность антиГК терапии может быть связана с исходным уровнем кортизола [33]. Недостаточный учет этого фактора может быть одной из основных причин несоответствия результатов эффективности антиГК терапии, о которых сообщают разные группы исследователей.

4. АНТАГОНИЗМ ГР

Считается, что антагонизм ГР имеет значительную терапевтическую ценность при психопатологиях, связанных со стрессом. Существует ряд доклинических доказательств того, что антагонисты ГР предотвращают провоспалительные эффекты, вызванные избыточным действием ГР [9]. Однако было показано, что блокада всех ГР-зависимых процессов в мозге может привести к неблагоприятным последствиям, таким как повышение уровня эндогенного кортизола [34], что неудивительно, учитывая важную роль ГР в балансировании стрессовой реакции.

4.1. Мифепристон (RU486) как прототип антагониста ГР

Хотя в качестве антиГР терапии как в экспериментальных, так и в клинических условиях использовали целый ряд веществ с различными механизмами действия (рис. 1), большинство опубликованных данных относится к мифепристону (RU486, 11-[4-(диметиламино) фенил]-17-гидрокси-17-[1-пропинил]-[11,17]-эстра-4,9-диен-3-он). Мифепристон (MIF), в клинике используемый в основном для прерывания беременности, является синтетическим перорально активным стероидом с мощной антиГК, антипрогестагенной и слабой антиандрогенной активностью и действует как конкурентный антагонист рецепторов прогестерона в присутствии прогестерона и как частичный агонист в отсутствие прогестерона [35]. MIF в более высоких дозах, чем требуется для антагонизма с прогестероном, демонстрирует в 18 раз более высокое сродство к ГР, чем кортизол.

В экспериментах MIF подавлял перегрузку ГК в разных животных моделях болезни ЦНС, от различных патологий, вызванных стрессом, до диабета, алкогольной абстиненции и болезни Альцгеймера. Атрофия гиппокампа и нарушение его функции, вызванные однократным травматическим опытом, хроническим стрессом, неблагоприятными условиями в раннем онтогенезе или экзогенным кортикостероном, быстро восстанавливались при кратковременном приеме MIF. Этот поразительный эффект смешанного антагониста прогестерона/ГК имитируется более специфическими антиглюкокортикоидными препаратами, такими как CORT 108297, Dazucorilant или CORT 113176. MIF и родственные антагонисты ГР быстро обращают нейродегенера-

цию и чрезмерную активацию нейронов, восстанавливают нейрогенез в гиппокампе и смягчают когнитивные нарушения [35, 36]. В гиппокампе грызунов MIF и родственные ему более селективные антагонисты ГР могут быстро снижать маркеры провоспалительной активности, эксайтотоксичности, нормализовать активацию нейронов и предотвращать проявление структурных особенностей атрофии гиппокампа [36]. Согласно проведенному недавно анализу, MIF способен «перезагружать» активность стрессовой системы в результате антагонизма ГР. MIF предотвращает повреждающие эффекты высоких концентраций ГК в результате гиперактивации ГР; продолжающегося реципрокного подавления активности ГГНО; действия MIF как агониста в промоторе транскрипции клеточного и контекст-зависимого привлечения коактиваторов и корепрессоров в «стрессорные сети» мозга; усиления активации МР мозга и модификации баланса МР: ГР [37]. ГР, на которые нацелен MIF, расположены в элементах ГГНО, но, по-видимому, также и в лимбико-фронтотерминальных и мезокортикальных дофаминергических сетях, вовлеченных в регуляцию настроения, тревоги, вознаграждения и мотивации.

Влияние MIF на ГГНО зависит от дозы, пути и частоты введения (имеющиеся данные обобщены в работах [9, 37]). По сравнению с экспериментальными животными, у людей биодоступность MIF выше, поскольку он циркулирует в связанной с гликопротеином $\alpha 1$ форме и, следовательно, имеет более длительный период полураспада, чем у грызунов, у которых такой связывающий белок отсутствует. Несмотря на проблемы со специфичностью, MIF оказался клинически эффективным в лечении патологических состояний, характеризующихся гиперкортизолемией. В последние десятилетия активно изучаются возможности применения MIF в медицине для лечения синдрома Кушинга и большой психотической депрессии [38]. MIF является эффективным препаратом для лечения эндогенного синдрома Кушинга любой этиологии, а при психических заболеваниях действие MIF распространяется не только на аффективные симптомы. MIF (Korlym®), рекомендованный для лечения гипергликемии у пациентов с синдромом Кушинга, вызывает значительное улучшение метаболизма, уменьшает депрессивные симптомы, улучшает когнитивные способности и повышает качество жизни [39]. Лечение MIF оказалось эффективным и хорошо переносимым при лечении психоза при психотической большой депрессии [40]. Однако следует отметить, что данные о действии MIF при психических заболеваниях остаются противоречивыми, по крайней мере отчасти из-за его неспецифичности в отношении антиГР механизмов.

4.2. Разработка антагонистов ГР

Хотя клиническое применение имеющихся в настоящее время антиГК препаратов остается ограниченным из-за их низкой специфичности и некоторых неблагоприятных побочных эффектов, разработка препаратов, специфически нацеленных на ГР, может привести к инновационным стратегиям в лечении аффективных расстройств.

Непредсказуемо – селективные модуляторы ГР оказались лигандами, которые могут действовать как агонисты и как антагонисты, как, например, высокоаффинный лиганд ГР C108297 (4Ag)-4a-(этоксиметил)-1-(4-фторфенил)-6-[4-(трифторметил)фенил]сульфонил-4,5,7,8-тетрагидропиразоло[3-g]изохинолин, показавший себя как селективный модулятор ГР в мозге крыс. По сравнению с полным агонистом ГР дексаметазоном и антагонистом ГР MIF, C108297 обладает уникальным профилем взаимодействия между ГР и его downstream эффекторными молекулами, корегуляторами ядерных рецепторов. C108297 обладает неполной активностью агониста, подавляя экспрессию генов КРГ и усиливая ГР-зависимую консолидацию памяти, но не оказывает агонистического действия на экспрессию КРГ в центральной миндалине и не является антагонистом опосредованного ГР снижения гиппокампального нейрогенеза после хронического воздействия кортикостерона [9]. Предполагается, что C108297 представляет класс лигандов, способных более избирательно блокировать неблагопри-

ятные ГР-зависимые процессы в мозге, сохраняя при этом полезные аспекты функционирования ГР. CORT108297 фармакологически вмешивается в сигнализацию ГР и может отменять по крайней мере некоторые эффекты стресса, которому грызунов подвергали в подростковом возрасте, на эмоциональное поведение и развитие нейронных сетей [41]. CORT108297 предотвращает вызванное ГК снижение гиппокампального нейрогенеза у нормальных мышей, нормальных крыс и мутантных мышей Wobbler, предотвращает патологию спинного мозга, проявляя противовоспалительную и антиглутаматергическую активность; он также подавляет вызванное диетой ожирение и воспаление [35, 37]. MIF, C-108297 и другой антагонист ГР, C-113176, препятствуют развитию патологии альцгеймеровского типа и когнитивных нарушений при введении амилоида- β (25–35) в гиппокамп грызунов. Таким образом, для целенаправленного лечения патологий мозга могут быть использованы более селективные модуляторы ГР.

4.3. Эндогенные антиглюкокортикоиды

В отличие от повышенного уровня кортизола, высокий уровень дегидроэпиандростерона (DHEA) и его сульфатированной формы DHEA(S), эндогенных нейроактивных стероидов с антиГК свойствами, связан с нейропротекцией и здоровым старением. С функциональной точки зрения DHEA может рассматриваться как эндогенный антиглюкокортикоид. Дисбаланс соотношения кортизол/DHEA(S) ассоциирован с патофизиологией психических расстройств, связанных со стрессом [42]. Повышенное соотношение кортизол/DHEA может быть маркером депрессивных расстройств и способствовать связанным с ними нарушениям обучения и памяти [43]. Уровни кортизола и DHEA(S) коррелируют с тяжестью симптомов при первом эпизоде психоза. В большом лонгитудинальном когортном исследовании пожилых мужчин и женщин более высокие уровни DHEA(S) были связаны со снижением риска развития депрессивных симптомов [15]. Имеются данные, что антиГК эффект DHEA обеспечивает защиту от патологического воздействия кортизола, а соотношение кортизол/DHEA может быть практичным биологическим маркером резистентной к лечению депрессии (ДРЛ) [44]. Прием DHEA, как и других антиГК средств, может уменьшить нейрокогнитивные нарушения при депрессии [43], однако лечение экзогенным DHEA, по-видимому, не имеет преимуществ по сравнению с другими антиГК вмешательствами.

Примечательно, что принципиально иной подход к экспериментальной антиГК генной терапии, заключающийся в гиперэкспрессии фермента 11-бета-гидроксистероид-дегидрогеназы (тип II) в нейронах гиппокампа, позволил блокировать негативное влияние повышенного уровня кортикостерона на пространственную память, возбудимость нейронов гиппокампа и синаптическую пластичность у мышей [45]. Эти данные позволяют предположить, что в дальнейшем целесообразно рассмотреть подходы к антиГК генной терапии.

5. АНТИГЛЮКОКОРТИКОИДНОЕ ЛЕЧЕНИЕ АФФЕКТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

5.1. Большое депрессивное расстройство

Терапия большого депрессивного расстройства (БДР) остается глобальной проблемой, поскольку существующие фармакотерапевтические средства не являются полностью эффективными. Считается, что БДР связано с изменениями нейропластичности в определенных, в частности, лимбических областях мозга, которые ассоциированы с тяжестью симптомов, негативными эмоциональными переживаниями и обучением страху. БДР связано с атрофией нейронов в коре и лимбических областях мозга, которые контролируют настроение и эмоции. Терапия антидепрессантами благотворно влияет на нейропластичность и может обратить вспять нейроанатомические изменения, обнаруженные у пациентов с депрессией [46]. Поскольку ГК контролируют пути

передачи сигнала, связанные с нейрогенезом в гиппокампе, антиГК, как и обычные антидепрессанты, могут устранять симптомы депрессии путем усиления нейрогенеза [47].

У пациентов с БДР, как и при многих других психических заболеваниях, описана дисрегуляция ГГНО. Наблюдается стойкое повышение уровня кортизола (конечного продукта ГГНО) и нарушение механизма торможения ГГНО по принципу отрицательной обратной связи. У пациентов с БДР хорошо документирован гиперкортицизм и его устойчивость к подавлению дексаметазоном. Поэтому казалось разумным думать, что препараты, нарушающие биосинтез кортизола, могут привести к ремиссии [48], и было высказано предположение, что снижающие уровень кортизола препараты могут быть клинически релевантными у определенных пациентов с БДР и другими гиперкортизолемическими состояниями [49].

Следует отметить, что степень и особенности дисфункции ГГНО у пациентов с БДР очень разнообразны. Возможно, существует множество факторов, влияющих на характер нарушений ГГНО при БДР, но этот вопрос остается малоизученным. У пациентов с БДР дисфункция ГГНО может зависеть от возраста. Nandam с соавт. [50] провели анализ ассоциаций между дисфункцией ГГНО и уровнем кортизола в моделях БДР у грызунов, а также у пациентов в зависимости от типа БДР, пола и лечения. Как и ожидалось, повышенный ответ кортизола на стресс связан с острой и тяжелой, но не с легкой или атипичной формой БДР. У женщин с БДР выявлена большая вариабельность кортизолового ответа, но не более высокие исходные уровни кортизола.

Дисрегуляция ГГНО связана с развитием БДР не только в зрелом возрасте. Мета-анализ показал, что повышенный кортизол утром предшествует развитию депрессии у подростков, что подтверждает роль гиперактивности ГГНО в развитии БДР в подростковом возрасте [51]. Повышенный утренний и ночной уровни кортизола можно рассматривать как факторы риска развития депрессии в подростковом возрасте, но не как биомаркеры уже имеющегося БДР. Hirtz с соавт. [52] показали, что метаболом стероидов надпочечников при БДР у подростков имеет четкий паттерн, указывающий на специфические особенности нарушения ГГНО. Тем не менее, Nandam с соавт. [50] сделали вывод о том, что, хотя большинство современных методов лечения БДР влияют на уровень кортизола, убедительной связи между уровнем кортизола и терапевтическим ответом ни в клинических, ни в доклинических условиях обнаружить не удалось.

Новые стратегии терапии БДР включают использование различных препаратов, классифицируемых как «антиГК» (ингибирование гипоталамического выброса КРГ, антагонизм рецепторов КРГ1, антагонизм рецепторов вазопрессина V1b, ингибирование синтеза кортизола, антиГК лечение с помощью DHEA, лечение антагонистами и агонистами ГР и т.д.) [53]. Важно отметить, что эффективное лечение антидепрессантами, как полагают, запускает и поддерживает связанные с ГР клеточные процессы, необходимые для восстановления после БДР. Классические антидепрессанты действуют опосредованно, влияя на динамическое взаимодействие между серотониновой нейротрансмиссией и ГГНО [54].

АнтиГК стратегии при гиперкортизолемических состояниях с особым акцентом на аффективные расстройства обсуждаются с начала 90-х годов. Анализ поведенческих эффектов применения антикортизолемических препаратов при синдроме Кушинга и БДР (часто связанных с гиперсекрецией кортизола) в небольших исследованиях позволил предположить, что такие вмешательства уменьшают депрессивные симптомы и дают надежду на разработку нового класса антидепрессантов для пациентов с гиперкортизолемической депрессией [55]. Прием кетоконазола (антиГК и противогрибковый препарат) при гиперкортизолемической депрессии приводил к уменьшению уровня кортизола в сыворотке крови и снижению степени проявления депрессивных симптомов [56–58]. Антагонист ГК MIF (RU486) также был эффективен в предварительных исследованиях на пациентах с БДР [59]. Кетоконазол, MIF и DHEA обсужда-

лись как потенциальные новые агенты, изменяющие настроение, а лечение антиГК препаратами было признано полезным в определенных подгруппах пациентов с БДР [60]. Доклинические испытания продемонстрировали антидепрессивный профиль метирапона, блокирующего стероидогенез кортизола путем действия в качестве обратимого ингибитора 11 β -гидроксилазы [61].

Hirtz с соавт. [52] предположили, что соотношение кортизол/DHEA может использоваться в психиатрии для выявления пациентов, которым потенциально может помочь лечение антиГК, или пациентов с высоким риском рецидива в случае сохранения дисфункции ГГНО. Индивидуальные различия в специфических нарушениях ГГНО могут хотя бы частично объяснить, почему результаты многочисленных исследований, посвященных использованию модулирующих ГГНО препаратов для лечения БДР, остаются противоречивыми, а эффективность этих лекарств при БДР по-прежнему подвергается сомнению. Хотя доклинические данные свидетельствуют о том, что антагонисты рецепторов КРГ1 полезны в лечении депрессии, нет подтвержденных данных контролируемых исследований об их клинической эффективности у пациентов с депрессией. Благоприятное влияние нейроактивного стероида DHEA, ингибитора синтеза кортизола метирапона и антагониста ГР MIF на БДР было продемонстрировано в нескольких небольших двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях. Однако в ряде недавно завершенных исследований не удалось выявить существенного отличия эффектов MIF от плацебо при БДР [53]. Тем не менее, метаанализ, недавно проведенный Ding с соавт., показал, что эффективность препаратов, направленных на ГГНО, при БДР значительна, а анализ подгрупп выявил, что пациентам с БДР может быть полезно лечение MIF и антагонистами вазопрессиновых рецепторов V1B, которые имеют приемлемые побочные эффекты [62].

5.2. Резистентная к лечению депрессия

Многие пациенты с БДР страдают резистентной к лечению депрессией (ДРЛ), демонстрируя отсутствие адекватного ответа на два последовательных курса антидепрессантов. Гиперкортизолемиа, хорошо описанная при депрессии, может быть важным фактором, связанным с резистентностью к лечению. В целом дисрегуляция ГГНО ассоциирована с отсутствием ответа на антидепрессанты и рецидивом после успешного лечения. Резистентность к лечению при БДР также связывают, как проспективно, так и ретроспективно, с усилением воспаления, и воспалительная активность может быть еще одним ключевым фактором, влияющим на ответ на антидепрессанты. Доклинические данные показали, что совместное с кортикостероидами введение приводило к снижению способности селективных ингибиторов обратного захвата серотонина повышать уровень 5-гидрокситриптамина в переднем мозге, а совместное введение с антиГК оказывало противоположный эффект [63]. Двойное слепое, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование дополнительного к серотонинергическим антидепрессантам назначения метирапона показало, что прием этого ингибитора синтеза кортизола имел преимущество перед плацебо в снижении баллов по шкале оценки депрессии Монтгомери-Асберга у пациентов с БДР [64]. Однако в другом исследовании метирапон, потенциально эффективный при БДР, не снижал уровень кортизола у пациентов с ДРЛ, вероятно, из-за гиперкомпенсации системы ГК [65]. В третьем исследовании сообщалось, что метирапон, используемый в дополнение к серотонинергическим антидепрессантам при ДРЛ, не показал эффективности в широко репрезентативной популяции таких пациентов [66]. Результаты рандомизированного контролируемого исследования дополнительного назначения при БДР метирапона наряду с антидепрессантами показали, что, хотя метирапон хорошо переносился пациентами, он оказался неэффективным в лечении ДРЛ [67]. Большинство авторов предполагают, что будущие исследования должны быть направлены на лечение антиГК у пациентов с подтвержденной гиперкортизолемией. Это может быть разумным подходом, поскольку прове-

денный метаанализ уровня кортизола в выборках пациентов, получавших ингибиторы синтеза кортизола (метирапон и кетоконазол) и антагонист ГР (MIF) показал, что только у пациентов с более высоким исходным уровнем кортизола был очевиден эффект лечения ингибиторами синтеза кортизола; другими словами, содержание кортизола было прогностическим биомаркером для успешного лечения пациентов с расстройствами настроения этими препаратами [19].

5.3. Биполярное расстройство, шизоаффективное расстройство

Поскольку при биполярном расстройстве отмечается повышенный уровень кортизола, а гиперкортизолемиа может усугублять как нейрокогнитивные нарушения, так и депрессивные симптомы, для улучшения нейрокогнитивных функций и ослабления депрессивных симптомов было предложено использовать антиГК препараты, в частности, антагонисты кортикостероидных рецепторов. В небольшом исследовании с двойным слепым перекрестным дизайном на 20 пациентах с биполярным расстройством MIF вызвал селективное улучшение нейрокогнитивных функций и настроения, это позволяет предположить, что антагонисты ГР могут обладать полезными когнитивными и, возможно, антидепрессивными свойствами при биполярном расстройстве [68]. Были получены предварительные данные о том, что лечение MIF привело к небольшому, но значительному снижению активности ГГНО и периферического уровня кортизола у пациентов с биполярным расстройством и шизофренией [69, 70]. В небольшом плацебо-контролируемом исследовании лечение кетоконазолом пациентов с шизоаффективным расстройством (с нарушениями настроения) и шизофренией было ассоциировано со значительным ослаблением симптомов депрессии только по оценке наблюдателя; при субъективной оценке депрессии, оценке психотических симптомов или когнитивных показателей эффект кетоназола показать не удалось [71]. Эти данные частично подтверждают гипотезу о том, что антиГК уменьшают депрессивные симптомы у пациентов с шизоаффективным расстройством и шизофренией, хотя необходимы исследования с большим объемом выборки.

6. ПОМИМО АФФЕКТИВНЫХ СИМПТОМОВ: КОГНИТИВНАЯ ДИСФУНКЦИЯ, МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Важно отметить, что фармакологические манипуляции с ГК могут быть продуктивными как в отношении нарушений эмоциональной сферы, так и в отношении дефицита памяти. Это ожидаемо, поскольку тот факт, что длительное повышение уровня ГК может привести к нарушениям настроения и когнитивных функций, представляется несомненным. У пациентов с эндогенной депрессией гиперкортизолемиа может быть ассоциирована с когнитивной дисфункцией и, возможно, уменьшением объема гиппокампа [60]. В каждом из этих состояний снижение уровня ГК либо путем прекращения стероидной терапии, либо с помощью антиГК агентов ослабляет неблагоприятные эффекты на поведение. И наоборот, традиционные антидепрессанты, помимо специфического воздействия на нейротрансмиссию, могут стабилизировать настроение путем влияния на ГГНО. Существует множество доказательств того, что депрессия, особенно у пожилых людей, ассоциируется со значительными когнитивными нарушениями. Коморбидность обоих синдромов может быть объяснена существованием нескольких перекрывающихся патофизиологических процессов, играющих ключевую роль в этиологии как депрессии, так и деменции. Синдром «стресса», проявляющийся в повышении уровня кортизола, наблюдается у 70% пациентов с депрессией, а также при болезни Альцгеймера. Повреждение нейронов гиппокампа, вызванное стрессом, приводит к эмоциональным и когнитивным нарушениям, причем и те, и другие опосредованы нейровоспалительными механизмами [72]. БДР является продромальным и одним из

компонентов болезни Альцгеймера, а также может быть пусковым механизмом развития болезни Альцгеймера. При обеих патологиях нарушается ГГНО, а ГК оказывают выраженное дегенеративное действие на гиппокамп [26].

Клинические исследования сообщают о частой коморбидности депрессии и диабета, причем оба заболевания ассоциированы с сопоставимыми изменениями в структуре и функции гиппокампа и сопоставимыми нарушениями когнитивных процессов. Некоторые морфологические и функциональные трансформации, происходящие при этих заболеваниях, связаны с увеличением содержания ГК, провоспалительных цитокинов и гиперглутаматергическим состоянием [7, 73]. Избыток ГК, вызванный стрессом, не только влияет на синаптическую пластичность гиппокампа, но и нарушает метаболизм глюкозы в мозге и снижает чувствительность к инсулину, тем самым ограничивая поступление энергии для поддержания оптимальной пластичности нейронов. Дисфункция ГГНО представляет собой нейроэндокринную связь между стрессом, депрессией и диабетом. У людей с аффективными расстройствами чаще встречается гиперкортизолемиа, сопровождающаяся инсулинорезистентностью. Использование антиГК препаратов в лечении расстройств настроения, связанных с метаболической дисфункцией, до сих является дискуссионным. Лечение антиГК препаратом MIF пациентов, получающих лечение от депрессивных расстройств и исходно эутимичных, способствовало улучшению внимания и вербального обучения, что было ассоциировано со снижением уровня глюкозы в плазме крови [74].

Еще одно потенциальное применение антиГК препаратов – снижение неблагоприятных побочных эффектов лекарств, рутинно используемых для лечения психических заболеваний. Например, прием антипсихотических препаратов, в том числе оланзапина, ассоциирован со значительным увеличением веса и нарушением обмена веществ. Имеются предварительные данные о том, что совместное применение мирикориланта, селективного модулятора ГР, с оланзапином может ослабить эти эффекты [75].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Именно весь мозг, а не только его небольшая часть, управляет стрессовыми реакциями и старается изо всех сил интегрировать возможности всего организма»

De Kloet [36]

Реакция на стресс охватывает различные области и уровни мозга – от молекулярных до нейронных цепей, но в данном обзоре мы сосредоточились на гиппокампе. Во-первых, гиппокамп – это структура мозга, координирующая и контролирующая как познание, так и эмоции. После обнаружения рецепторов ГК в гиппокампе и других областях мозга исследования были направлены на понимание эффектов ГК в мозге и их роли в регуляции эмоций и когнитивных функций. Во-вторых, гиппокамп избирательно уязвим к стрессу, ГК и нейровоспалению, а значит изучение этой структуры может облегчить понимание некоторых ключевых механизмов стресс-ассоциированных аффективных расстройств и сопутствующих им заболеваний. В-третьих, по сравнению с другими областями мозга лимбическая система более подробно изучена в отношении реакции на стресс и контроля со стороны ГГНО при аффективных расстройствах и других стресс-ассоциированных патологиях мозга.

ГК жизненно важны для адаптации к стрессовым факторам (аллостаз) и для дезадаптации в результате аллостатической нагрузки и перегрузки, возникающих при хроническом стрессе и патологически перестраивающих ГГНО [76]. Однако попытки использовать абсолютный уровень кортизола для прогнозирования эффективности антидепрессивной терапии дали противоречивые результаты и пока представляются не до конца обоснованными. Неспособность выявить точные ассоциации между аб-

солютным уровнем кортизола и результатами лечения и вывод о ненадежности этого биомаркера [50] могут быть обусловлены рядом причин, лежащих в основе этого пробела в исследованиях. К ним относятся исходные различия в индивидуальном уровне кортизола, разнообразные влияния возраста, пола, типа и длительности заболевания на функцию ГНО, вызывающие многообразные изменения показателей ГНО и их соотношений, соответствующие различным состояниям в континууме, образованном потенциально многочисленными состояниями этой сложной нейрогуморальной системы.

АнтиГК могут оказывать антидепрессивное действие и, как показано, эффективны при лечении тяжелых психических расстройств. Однако между данными различных исследований существуют противоречия, связанные с методологическими различиями в отношении используемых препаратов, когорт пациентов и дизайна исследования. Поэтому применение антиГК в лечении аффективных расстройств пока находится на стадии доказательства концепции, и это результат несоответствия между хорошей теоретической основой для концепции, преимущественно положительными данными доклинических исследований и противоречивыми клиническими данными. Тем не менее воздействие на ГНО и рецепторы ГК выглядит очень перспективным, а множество доклинических и ряд клинических данных создают основу для более комплексных исследований в будущем. Для обоснования полученных результатов по-прежнему необходимы дополнительные крупные рандомизированные контролируемые исследования в клинике.

Примечательно, что хронический избыток ГК ассоциируется не только с аффективными расстройствами, но и с когнитивным снижением, метаболическими нарушениями, диабетом. АнтиГК (модифицирующая ГНО) терапия способна облегчить аффективные симптомы, когнитивные нарушения, резистентность к ГК и инсулину,

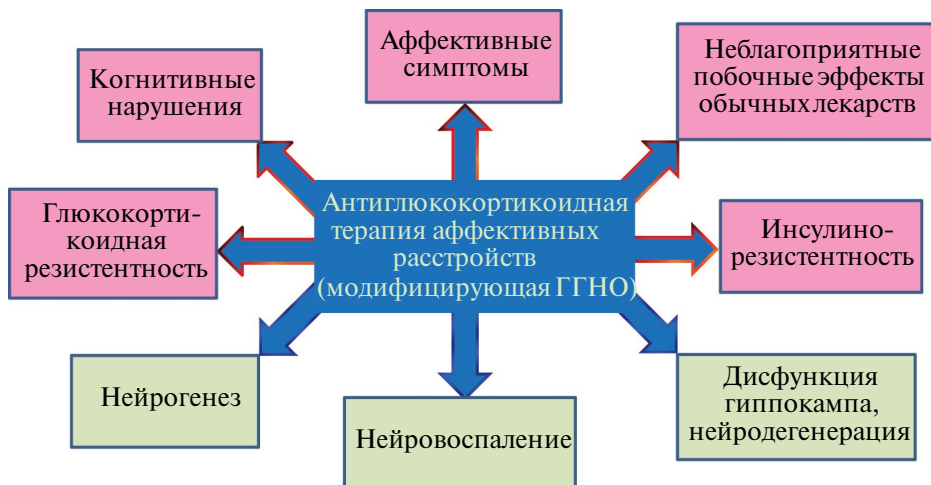


Рис. 2. Основные симптомы и процессы, на которые может повлиять антиглюкокортикоидная терапия аффективных расстройств [1, 3, 17, 25, 20, 36, 65, 78, 79]. АнтиГК терапия (на примере мифепристона) в клинических исследованиях и на моделях аффективных расстройств на грызунах может снизить аффективные симптомы, уменьшить когнитивные нарушения, преодолеть побочные эффекты традиционных препаратов, снизить глюкокортикоидную и инсулиновую резистентность. В исследованиях на животных антиГК препараты обращают или предотвращают дисфункцию гиппокампа и нейродегенерацию, уменьшают нейровоспаление и улучшают нарушенный нейрогенез.

а также побочные эффекты традиционных препаратов за счет благоприятного воздействия на дисфункцию гиппокампа и нейродегенерацию, нейровоспаление и нейрогенез (рис. 2). Уровень ГР быстро повышается после эпилептического статуса и остается повышенным в течение нескольких недель после травмы. Специфический модулятор ГР CORT108297 нормализует уровень кортикостерона и уменьшает патологические проявления в мозге после эпилептического статуса [77]. Становится ясно, что ассоциированная со стрессом и избытком ГК опосредованная нейровоспалением патология лимбической системы и, в частности, гиппокампа является общей чертой, характерной для многих заболеваний мозга, имеющих общие механизмы, в частности, в случаях коморбидности аффективных расстройств с другими церебральными патологиями. Появляются новые модуляторы МР и ГР, которые потенциально могут перезапустить разрегулированную систему стрессового ответа [6, 17, 78, 79] и быть использованы в лечении различных заболеваний мозга. Однако для подтверждения этого оптимистичного прогноза необходимо провести дополнительные крупные рандомизированные контролируемые исследования, чтобы подтвердить полученные к настоящему времени доклинические и клинические результаты.

ВКЛАД АВТОРОВ

Автор самостоятельно разработал концепцию статьи и в полном объеме осуществил ее создание.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Московского центра инновационных технологий в здравоохранении, грант № 0602–3/23. 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

Автор данной работы заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McEwen BS, Akil H (2020) Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders. *J Neurosci* 40: 12–21.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0733–19.2019>
2. Dhikav V, Anand KS (2007) Is hippocampal atrophy a future drug target? *Med Hypotheses* 68: 1300–1306.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.09.0402>
3. Gulyaeva NV (2019) Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. *Neurochem Res* 44: 1306–1322.
<https://doi.org/10.1007/s11064–018–2662–0>
4. Gulyaeva NV (2019) Biochemical Mechanisms and Translational Relevance of Hippocampal Vulnerability to Distant Focal Brain Injury: The Price of Stress Response. *Biochemistry (Mosc)* 84: 1306–1328.
<https://doi.org/10.1134/S0006297919110087>
5. Uchoa ET, Aguilera G, Herman JP, Fiedler JL, Deak T, de Sousa MBC (2014) Novel aspects of glucocorticoid actions. *J Neuroendocrinol* 26: 557–572.
<https://doi.org/10.1111/jne.12157>
6. de Kloet ER, Joëls M (2023) The cortisol switch between vulnerability and resilience. *Mol Psychiatry* 29 (1): 20–34.
<https://doi.org/10.1038/s41380–022–01934–8>

7. *Gulyaeva NV* (2023) Glucocorticoids Orchestrate Adult Hippocampal Plasticity: Growth Points and Translational Aspects. *Biochemistry (Mosc)* 88: 565–589.
<https://doi.org/10.1134/S0006297923050012>
8. *Joëls M, Sarabdjitsingh RA, Karst H* (2012) Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes. *Pharmacol Rev* 64: 901–938.
<https://doi.org/10.1124/pr.112.005892>
9. *de Kloet ER, de Kloet SF, de Kloet CS, de Kloet AD* (2019) Top-down and bottom-up control of stress-coping. *J Neuroendocrinol* 31: e12675.
<https://doi.org/10.1111/jne.12675>
10. *de Kloet ER* (2013) Functional profile of the binary brain corticosteroid receptor system: mediating, multitasking, coordinating, integrating. *Eur J Pharmacol* 719: 53–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.053>
11. *Sousa N, Cerqueira JJ, Almeida OF* (2008) Corticosteroid receptors and neuroplasticity. *Brain Res Rev* 57: 561–570.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.007>
12. *Madalena KM, Lerch JK* (2017) The Effect of Glucocorticoid and Glucocorticoid Receptor Interactions on Brain, Spinal Cord, and Glial Cell Plasticity. *Neural Plast* 8640970.
<https://doi.org/10.1155/2017/8640970>
13. *Jeanneteau F, Borie A, Chao MV, Garabedian MJ* (2019) Bridging the Gap between Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glucocorticoid Effects on Brain Networks. *Neuroendocrinology* 109: 277–284.
<https://doi.org/10.1159/000496392>
14. *Kim JS, Iremonger KJ* (2019) Temporally Tuned Corticosteroid Feedback Regulation of the Stress Axis. *Trends Endocrinol Metab* 30: 783–792.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.07.005>
15. *Souza-Teodoro LH, de Oliveira C, Walters K, Carvalho LA* (2016) Higher serum dehydroepiandrosterone sulfate protects against the onset of depression in the elderly: Findings from the English Longitudinal Study of Aging (ELSA). *Psychoneuroendocrinology* 64: 40–46.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.11.005>
16. *Suri D, Vaidya VA* (2013) Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience* 239: 196–213.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.065>
17. *Martocchia A, Stefanelli M, Falaschi GM, Toussan L, March MR, Raja S, Romano G, Falaschi P* (2013) Targets of anti-glucocorticoid therapy for stress-related diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov* 8: 79–87.
<https://doi.org/10.2174/1574889811308010007>
18. *Podgorny OV, Gulyaeva NV* (2021) Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal damage: Contribution of subgranular neurogenesis. *J Neurochem* 157: 370–392.
<https://doi.org/10.1111/jnc.15265>
19. *Reus VI, Wolkowitz OM, Frederick S* (1997) Antigluocorticoid treatments in psychiatry. *Psychoneuroendocrinology* 22 Suppl 1: S121–S124.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(97\)00016-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(97)00016-4)
20. *Resmini E, Santos A, Webb SM* (2016) Cortisol Excess and the Brain. *Front Horm Res* 46: 74–86.
<https://doi.org/10.1159/000443868>
21. *Hill AR, Spencer-Segal JL* (2021) Glucocorticoids and the Brain after Critical Illness. *Endocrinology* 162: bqaa242.
<https://doi.org/10.1210/endo/bqaa242>
22. *Gulyaeva NV* (2017) Molecular Mechanisms of Neuroplasticity: An Expanding Universe. *Biochemistry (Mosc)* 82: 237–242.
<https://doi.org/10.1134/S0006297917030014>
23. *Bauer ME, Teixeira AL* (2019) Inflammation in psychiatric disorders: what comes first? *Ann N Y Acad Sci* 1437: 57–67.
<https://doi.org/10.1111/nyas.13712>
24. *Jeon SW, Kim YK* (2018) The role of neuroinflammation and neurovascular dysfunction in major depressive disorder. *J Inflamm Res* 11: 179–192.
<https://doi.org/10.2147/JIR.S141033>
25. *Adzic M, Brkic Z, Mitic M, Francija E, Jovicic MJ, Radulovic J, Maric NP* (2018) Therapeutic Strategies for Treatment of Inflammation-related Depression. *Curr Neuropharmacol* 16: 176–209.
<https://doi.org/10.2174/1570159X15666170828163048>
26. *Herbert J, Lucassen PJ* (2016) Depression as a risk factor for Alzheimer's disease: Genes, steroids, cytokines and neurogenesis – What do we need to know? *Front Neuroendocrinol* 41: 153–171.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.12.001>

27. *Bolshakov AP, Tret'yakova LV, Kvichansky AA, Gulyaeva NV* (2021) Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation. *Biochemistry (Mosc)* 86: 156–167.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921020048>
28. *Dhikav V, Anand KS* (2007) Is hippocampal atrophy a future drug target? *Med Hypotheses*. 68: 1300–1306.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.09.0402>
29. *Chisholm-Burns MA, Schwinghammer TL, Malone PM, Kolesar JM, Bookstaver PB, Lee KC* (eds) (2022) Appendix B – Common Laboratory Tests. In: *Pharmacotherapy Principles and Practice*. 6th Edition. McGraw-Hill Medical.
30. *Ben Assayag E, Tene O, Korczyn AD, Shopin L, Auriel E, Molad J, Hallevi H, Kirschbaum C, Bornstein NM, Shenhar-Tsarfaty S, Kliper E, Stalder T* (2017) High hair cortisol concentrations predict worse cognitive outcome after stroke: Results from the TABASCO prospective cohort study. *Psychoneuroendocrinology* 82: 133–139.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.05.013>
31. *Tene O, Hallevi H, Korczyn AD, Shopin L, Molad J, Kirschbaum C, Bornstein NM, Shenhar-Tsarfaty S, Kliper E, Auriel E, Usher S, Stalder T, Ben Assayag E* (2018) The Price of Stress: High Bedtime Salivary Cortisol Levels Are Associated with Brain Atrophy and Cognitive Decline in Stroke Survivors. Results from the TABASCO Prospective Cohort Study. *J Alzheimers Dis* 65: 1365–1375.
<https://doi.org/10.3233/JAD-180486>
32. *Wang J, Guan Q, Sheng Y, Yi Yang, Li Guo, Li W, Gu Y, Han C* (2021) The potential predictive value of salivary cortisol on the occurrence of secondary cognitive impairment after ischemic stroke. *Neurosurg Rev* 44: 1103–1108.
<https://doi.org/10.1007/s10143-020-01256-9>
33. *Lombardo G, Enache D, Gianotti L, Schatzberg AF, Young AH, Pariante CM, Mondelli V* (2019) Baseline cortisol and the efficacy of antiglucocorticoid treatment in mood disorders: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 110: 104420.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104420>
34. *Zalachoras I, Houtman R, Atucha E, Meijer OC* (2013) Differential targeting of brain stress circuits with a selective glucocorticoid receptor modulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 7910–7915.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1219411110>
35. *De Nicola AF, Meyer M, Guennoun R, Schumacher M, Hunt H, Belanoff J, de Kloet ER, Gonzalez Deniselle MC* (2020) Insights into the Therapeutic Potential of Glucocorticoid Receptor Modulators for Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 21: 2137.
<https://doi.org/10.3390/ijms21062137>
36. *de Kloet ER* (2023) Glucocorticoid feedback paradox: a homage to Mary Dallman. *Stress* 26: 2247090.
<https://doi.org/10.1080/10253890.2023.2247090>
37. *Dalm S, Karssen AM, Meijer OC, Belanoff JK, de Kloet ER* (2019) Resetting the Stress System with a Mifepristone Challenge. *Cell Mol Neurobiol* 39: 503–522.
<https://doi.org/10.1007/s10571-018-0614-5>
38. *Kakade AS, Kulkarni YS* (2014) Mifepristone: current knowledge and emerging prospects. *J Indian Med Assoc* 112: 36–40. PMID: 25935948
39. *Fleseriu M, Biller BM, Findling JW, Molitch ME, Schteingart DE, Gross C, SEISMIC Study Investigators* (2012) Mifepristone, a glucocorticoid receptor antagonist, produces clinical and metabolic benefits in patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 2039–2049.
<https://doi.org/10.1210/jc.2011-3350>
40. *DeBattista C, Belanoff J, Glass S* (2006) Mifepristone versus placebo in the treatment of psychosis in patients with psychotic major depression. *Biol Psychiatry* 60: 1343–1349.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.05.034>
41. *Cotella EM, Morano RL, Wulsin AC, Martelle SM, Lemen P, Fitzgerald M, Packard BA, Moloney RD, Herman JP* (2020) Lasting Impact of Chronic Adolescent Stress and Glucocorticoid Receptor Selective Modulation in Male and Female Rats. *Psychoneuroendocrinology* 112: 104490.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104490>
42. *Garner B, Phassouliotis C, Phillips L, Markulev C, Butselaar F, Bendall S, Yun Y, McGorry PD* (2011). Cortisol and dehydroepiandrosterone-sulphate levels correlate with symptom severity in first-episode psychosis. *J Psychiatr Res* 45: 249–255.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.06.008>
43. *Young AH, Gallagher P, Porter RJ* (2002) Elevation of the cortisol-dehydroepiandrosterone ratio in drug-free depressed patients. *Am J Psychiatry* 159: 1237–1239.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.7.1237>

44. Markopoulou K, Papadopoulos A, Juruena MF, Poon L, Pariante CM, Cleare AJ (2009) The ratio of cortisol/DHEA in treatment resistant depression. *Psychoneuroendocrinology* 34: 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.08.004>
45. Dumas TC, Gillette T, Ferguson D, Hamilton K, Sapolsky RM (2010) Anti-glucocorticoid gene therapy reverses the impairing effects of elevated corticosterone on spatial memory, hippocampal neuronal excitability, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 30: 1712–1720. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4402-09.2010>
46. Rădulescu I, Drăgoi AM, Trifu SC, Cristea MB (2021) Neuroplasticity and depression: Rewiring the brain's networks through pharmacological therapy (Review). *Exp Ther Med* 22: 1131. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10565>
47. Fitzsimons CP, van Hooijdonk LWA, Morrow JA, Peeters BWMM, Hamilton N, Craighead M, Vreugdenhil E (2009) Antiglucocorticoids, neurogenesis and depression. *Mini Rev Med Chem* 9: 249–264. <https://doi.org/10.2174/138955709787316001>
48. Murphy BE (1997) Antiglucocorticoid therapies in major depression: a review. *Psychoneuroendocrinology*. 22 Suppl 1: S125–S132. PMID: 9264159
49. Wolkowitz OM, Reus VI (1999) Treatment of depression with antiglucocorticoid drugs. *Psychosom Med* 6: 698–711. <https://doi.org/10.1097/00006842-199909000-00011>
50. Nandam LS, Brazel M, Zhou M, Jhaveri DJ (2020) Cortisol and Major Depressive Disorder-Translating Findings From Humans to Animal Models and Back. *Front Psychiatry* 10: 974. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00974>
51. Zajkowska Z, Gullett N, Walsh A, Zonca V, Pedersen GA, Souza L, Kieling C, Fisher HL, Kohrt BA, Mondelli V (2014). Cortisol and development of depression in adolescence and young adulthood – a systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 136: 105625. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105625>
52. Hirtz R, Libuda L, Hinney A, Föcker M, Bühlmeier J, Holterhus P-M, Kulle A, Kiewert C, Hauf-fa BP, Hebebrand J, Grasemann C (2022) The adrenal steroid profile in adolescent depression: a valuable bio-readout? *Transl Psychiatry* 12: 255. <https://doi.org/10.1038/s41398-022-01966-2>
53. Schüle C, Baghai TC, Eser D, Rupprecht R (2009) Hypothalamic-pituitary-adrenocortical system dysregulation and new treatment strategies in depression. *Expert Rev Neurother* 9: 1005–1019. <https://doi.org/10.1586/ern.09.52>
54. Maric NP, Adzic M (2013) Pharmacological modulation of HPA axis in depression – new avenues for potential therapeutic benefits. *Psychiatr Danub* 25: 299–305. PMID: 24048401
55. Wolkowitz OM, Reus VI, Manfredi F, Ingbar J, Brizendine L (1992) Antiglucocorticoid strategies in hypercortisolemic states. *Psychopharmacol Bull* 28: 247–251. PMID: 1480727
56. Wolkowitz OM, Reus VI, Manfredi F, Ingbar J, Brizendine L, Weingartner H (1993) Ketoconazole administration in hypercortisolemic depression. *Am J Psychiatry* 150: 810–812. <https://doi.org/10.1176/ajp.150.5.810>
57. Wolkowitz OM, Reus VI, Chan T, Manfredi F, Raum W, Johnson R, Canick J (1999) Antiglucocorticoid treatment of depression: double-blind ketoconazole. *Biol Psychiatry* 45: 1070–1074. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00267-4](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00267-4)
58. Anand A, Malison R, McDougale CJ, Price LH (1995) Antiglucocorticoid treatment of refractory depression with ketoconazole: a case report. *Biol Psychiatry* 37: 338–340. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(94\)00245-X](https://doi.org/10.1016/0006-3223(94)00245-X)
59. Murphy BE, Filipini D, Ghadirian AM (1993) Possible use of glucocorticoid receptor antagonists in the treatment of major depression: preliminary results using RU486. *J Psychiatry Neurosci* 18: 209–213. PMID: 8297920
60. Reus VI, Wolkowitz OM (2001) Antiglucocorticoid drugs in the treatment of depression. *Expert Opin Investig Drugs* 10: 1789–1796. <https://doi.org/10.1517/13543784.10.10.1789>
61. Healy DG, Harkin A, Cryan JF, Kelly JP, Leonard BE (1999) Metyrapone displays antidepressant-like properties in preclinical paradigms. *Psychopharmacology (Berl)* 145: 303–308. <https://doi.org/10.1007/s002130051062>
62. Ding Y, Wei Z, Yan H, Guo W (2021) Efficacy of Treatments Targeting Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Systems for Major Depressive Disorder: A Meta-Analysis. *Front Pharmacol* 12: 732157. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.732157>
63. McAllister-Williams RH, Smith E, Anderson IM, Barnes J, Gallagher P, Grunze HCR, Haddad PM, House AO, Hughes T, Lloyd AJ, McColl EMM, Pearce SHS, Siddiqi N, Sinha B, Speed C, Steen IN, Wainright J, Watson S, Winter FH, Ferrier IN (2013) Study protocol for the randomised controlled trial: antiglucocorticoid augmentation of anti-Depressants in Depression (The ADD Study). *BMC Psychiatry* 13: 205. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-13-205>

64. Sigalas PD, Garg H, Watson S, McAllister-Williams RH, Ferrier IN, Powell TR, Young AH, Cleare AJ, Watson S (2012) Metyrapone in treatment-resistant depression. *Ther Adv Psychopharmacol* 2: 139–149.
<https://doi.org/10.1177/2045125312436597>
65. Strawbridge R, Jamieson A, Hodsoll J, Ferrier IN, McAllister-Williams RH, Powell TR, Young AH, Cleare AJ, Watson S (2021) The Role of Inflammatory Proteins in Anti-Glucocorticoid Therapy for Treatment-Resistant Depression. *J Clin Med* 10: 784.
<https://doi.org/10.3390/jcm10040784>
66. McAllister-Williams RH, Anderson IM, Finkelmeyer A, Gallagher P, Grunze HCR, Haddad PM, Hughes T, Lloyd AJ, Mamasoula C, McColl E, Pearce S, Siddiqi N, Sinha BNP, Steen N, Wainwright J, Winter FH, Ferrier IN, Watson S, the ADD Study Team (2016) Antidepressant augmentation with metyrapone for treatment-resistant depression (the ADD study): a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Psychiatry* 3: 117–127.
[https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00436-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00436-8)
67. Ferrier IN, Anderson IM, Barnes J (2015) Randomised controlled trial of Antiglucocorticoid augmentation (metyrapone) of antiDepressants in Depression (ADD Study). Southampton (UK): NIHR J Library. PMID: 26086063
68. Young AH, Gallagher P, Watson S, Del-Estal D, Owen BM, Ferrier IN (2004) Improvements in neurocognitive function and mood following adjunctive treatment with mifepristone (RU-486) in bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 29: 1538–1545.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300471>
69. Gallagher P, Malik N, Newham J, Young AH, Ferrier IN, Mackin P (2008) Antiglucocorticoid treatments for mood disorders. *Cochrane Database Syst Rev* CD005168.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD005168.pub2>
70. Gallagher P, Watson S, Dye CE, Young AH, Ferrier IN (2008) Persistent effects of mifepristone (RU-486) on cortisol levels in bipolar disorder and schizophrenia. *J Psychiatr Res* 42: 1037–1041.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2007.12.005>
71. Marco EJ, Wolkowitz OM, Vinogradov S, Poole JH, Lichtmacher J, Reus VI (2002) Double-blind antiglucocorticoid treatment in schizophrenia and schizoaffective disorder: a pilot study. *World J Biol Psychiatry* 3: 156–161.
<https://doi.org/10.3109/15622970209150617>
72. Linnemann C, Lang UE (2020) Pathways Connecting Late-Life Depression and Dementia. *Front Pharmacol* 11: 279.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00279>
73. Detka J, Kurek A, Basta-Kaim A, Kubera M, Lason W, Budziszewska B (2013) Neuroendocrine link between stress, depression and diabetes. *Pharmacol Rep* 65: 1591–1600.
[https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71520-2](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71520-2)
74. Roat-Shumway S, Wroolie TE, Watson K, Schatzberg AF, Rasgon NL (2018) Cognitive effects of mifepristone in overweight, euthymic adults with depressive disorders. *J Affect Disord* 239: 242–246.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.07.014>
75. Hunt HJ, Donaldson K, Strem M, Tudor, IC, Sweet-Smith S, Sidhu S (2021) Effect of Miricorilant, a Selective Glucocorticoid Receptor Modulator, on Olanzapine-Associated Weight Gain in Healthy Subjects: A Proof-of-Concept Study. *J Clin Psychopharmacol* 41: 632–637.
<https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000001470>
76. Gray JD, Kogan JF, Marrocco J, McEwen BS (2017) Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nat Rev Endocrinol* 13: 661–673.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.97>
77. Wulsin AC, Kraus KL, Gaitonde KD, Suru V, Arafa SR, Packard BA, Herman JP, Danzer SC (2021) The glucocorticoid receptor specific modulator CORT108297 reduces brain pathology following status epilepticus. *Exp Neurol* 341: 113703.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113703>
78. Daskalakis NP, Meijer OC, de Kloet ER (2022) Mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor work alone and together in cell-type-specific manner: Implications for resilience prediction and targeted therapy. *Neurobiol Stress* 18: 100455.
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2022.100455>
79. Meijer OC, Koornneef LL, Kroon J (2018) Glucocorticoid receptor modulators. *Ann Endocrinol (Paris)* 79: 107–111.
<https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.03.004>

Augmented Cortisol and Antigluccorticoid Therapy in Mood Disorders: the Hippocampus as a Potential Drug Target

N. V. Gulyaeva^{a, b, *}

^aInstitute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bMoscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow, Russia

**e-mail: nata_gul@ihna.ru*

The pathophysiology of many mood disorders is closely related to abnormal stress response associated with the dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and cortisol overproduction. The hippocampus, a key structure of the limbic system responsible for both cognitive and emotional spheres, is selectively vulnerable to excess of glucocorticoids (GCs) inducing neuroinflammation and neurodegeneration. The antiGC therapy of psychiatric diseases, in particular depressive disorders, may be a useful additional treatment. Among other approaches, targeting glucocorticoid receptors, abounded in the hippocampus, is regarded as highly promising. However, though the preclinical data provide fairly firm evidence to the concept of antiGC therapy for stress-related diseases, clinical studies still are at the proof-of-concept stage. Noteworthy, chronic GC excess is associated not only with mood diseases, but also with cognitive decline, metabolic disorders, diabetes. Potentially, antiGC (HPA axis modifying) therapy may alleviate affective symptoms, cognitive disturbances, GC and insulin resistance and adverse side effects of conventional drugs through beneficial effects on the hippocampus mitigating its dysfunction and neurodegeneration, neuroinflammation, and impairment of neurogenesis. Since stress/GC-associated neuroinflammation-mediated pathology of the limbic system and, specifically, the hippocampus, is a general feature typical for many brain diseases, the concept of antiGC therapy may be extended, tested and validated in a wider spectrum of cerebral pathologies.

Keywords: mood diseases; hippocampus; stress, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis; cortisol; depression; glucocorticoids; antigluccorticoid therapy; glucocorticoid receptor, mifepristone

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**НАРУШЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЖЕЛЕЗА И ЦИНКА В ТКАНЯХ У МЫШЕЙ
ПРИ РОСТЕ ГЕПАТОМЫ 22А И ИХ КОРРЕКЦИЯ
С ПОМОЩЬЮ СУЛЬФАТА ЦИНКА**

© 2024 г. Е. А. Зеленский¹, К. В. Рутто¹, А. С. Трулев¹, Д. Н. Магазенкова¹,
А. В. Соколов¹, Е. П. Киселева^{1, 2, *}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова МЗ РФ,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ekissele@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.04.2024 г.

После доработки 01.06.2024 г.

Принята к публикации 02.06.2024 г.

Известно, что рост многих опухолей приводит к развитию дефицита железа и цинка в организме. Исследовали содержание этих металлов, а также удельную активность двух антиоксидантных металлоферментов – каталазы и супероксиддисмутазы в трех удаленных от опухоли органах (тимусе, печени и селезенке) при росте перевиваемой гепатомы 22а. Выявленные сдвиги сопоставляли с изменениями массы органов. На 21-е сутки опухолевого роста содержание негемового железа было снижено по сравнению с контролем во всех трех органах, а цинка – только в тимусе. Специфические активности каталазы и супероксиддисмутазы были повышены в тимусе, в то время как в печени активность супероксиддисмутазы снижена. На этом же сроке наблюдали развитие инволюции тимуса и спленомегалии. Для нормализации содержания металлов мыши с гепатомой 22а получали дополнительно 22 мкг сульфата цинка на мл питьевой воды в течение трех недель. Прием сульфата цинка частично компенсировал дефицит цинка в тимусе, повышал его содержание в печени и восстанавливал уровень железа в трех органах. Он также нормализовал активность супероксиддисмутазы в печени, но не влиял на ферменты в других органах. Прием цинка не влиял на массу селезенки и печени, но тормозил развитие инволюции тимуса. При этом в тимусе восстанавливался дефицит микроэлементов, а активность антиоксидантных ферментов не менялась. На основании этого можно заключить, что инволюция тимуса при росте гепатомы 22а связана с дефицитом железа и цинка и не связана с активностью антиоксидантных ферментов в этом органе, а спленомегалия не ассоциирована ни с тем, ни с другим в селезенке. Таким образом, сульфат цинка оказывает позитивное действие на метаболизм двух важнейших микроэлементов – цинка и железа в организме животных с гепатомой 22а, что способствует сохранению центрального органа иммунной системы – тимуса, а также положительно влияет на антиоксидантную систему печени.

Ключевые слова: инволюция тимуса, печень, селезенка, гепатома 22а, содержание цинка, содержание железа, соль цинка

ВВЕДЕНИЕ

Цинк и железо – два жизненно важных микроэлементов, между которыми в организме существует тесная взаимосвязь [1]. Имеются данные о снижении концентрации обоих микроэлементов в сыворотке крови при росте ряда опухолей у человека [2, 3] и животных [4]. Показано, что дефицит железа [5] и цинка [6, 7] у больных раком может оказывать неблагоприятное влияние на проводимую терапию и выживаемость. Это может являться следствием негативного влияния дефицита железа [8] и цинка [9, 10] на работу иммунной системы, что снижает способность организма сопротивляться инфекциям. Однако роль недостаточности этих микроэлементов в работе различных органов и систем при опухолевом росте мало изучена.

Анализ данных литературы указывает, что между изменениями, происходящими при опухолевом росте, имеется много общего с тем, что наблюдается в организме животных с пищевым дефицитом микроэлементов. Так, хорошо известно, что опухолевый рост сопровождается такими системными изменениями, как инволюция тимуса, сплено- и гепатомегалия, механизмы которых до сих пор остаются неизвестными [11]. У животных, находящихся на диете с недостаточным содержанием цинка, также развивается инволюция тимуса [12, 13]. Пищевой дефицит другого микроэлемента – железа вызывает у животных и атрофию тимуса и сплено- и гепатомегалию [14–16]. Нехватка цинка в организме рассматривается также в качестве одной из важных причин инволюции тимуса при старении [17].

Однако существует ли связь между дефицитом металлов и изменениями массы этих органов при опухолевом росте, неизвестно. Еще в 50-е годы XX века из гомогената опухолевой ткани животных был получен полипептид, названный «токсогормоном», который при введении интактным животным вызывал инволюцию тимуса, сплено- и гепатомегалию, а также гипоперремию, анемию и снижение активности каталазы в печени [18]. К сожалению, действующее начало «токсогормона» так и не было установлено [19].

Сходства между пищевым дефицитом микроэлементов и опухолевым ростом имеются также и в развитии системного окислительного стресса. Хорошо известно, что его вызывает дефицит цинка [20], а в последнее время появились указания на то, что этому способствует и дефицит железа [5, 8].

Системный окислительный стресс при опухолевом росте проявляется в повышенном содержании продуктов перекисидации липидов и дисбалансе антиоксидантных ферментов в крови пациентов [21], а также в печени и селезенке при росте экспериментальных опухолей [22, 23]. Предполагается, что повышение генерации активных форм кислорода (АФК) в удаленных от опухоли органах может являться причиной развития в них функциональных и морфологических нарушений. Так, например, усиление апоптоза тимоцитов [24] и появление дегенеративных изменений в печени [23] связывают с повышением генерации АФК в этих органах при росте карциномы Эрлиха.

Однако влияние опухолевого роста на развитие окислительного стресса в удаленных от опухоли органах изучено недостаточно, этому вопросу посвящены лишь единичные исследования. Между тем оценка нарушений антиоксидантной защиты в удаленных от опухоли тканях, в том числе и в органах иммунной системы, может иметь важное значение для их нормального функционирования. Например, существование связи между окислительным стрессом и атрофическими изменениями в тимусе широко обсуждается при старении [25], однако при опухолевом росте подобный механизм развития инволюции тимуса не изучался.

Приведенные данные позволили нам создать гипотезу о возможной связи изменения массы тимуса, селезенки и печени при опухолевом росте с нарушением содержания в этих органах двух важных микроэлементов – железа и цинка, а также со связанным с этим изменением тканевого окислительно-восстановительного потенциала.

Работу проводили на модели перевиваемой гепатомы 22a у мышей, рост которой, как показано нами ранее, сопровождается снижением концентрации железа и цинка в сыворотке крови [26, 27]. В задачи исследования входило изучение содержания микроэлементов (железа и цинка) и активности металлосодержащих антиоксидантных ферментов – каталазы и Cu, Zn-супероксиддисмутазы (СОД) в удаленных от опухоли органах (тимусе, селезенке и печени) при опухолевом росте, а также изменение этих показателей после дополнительного приема сульфата цинка с питьевой водой. Полученные результаты сопоставляли с изменениями масс органов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работу проводили на мышах-самцах СЗНА массой тела 16–18 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» – ПИЯФ (Санкт-Петербург, Россия). Животные находились на стандартной диете и получали сухой комбикорм ПК-120 (Лаборторм, Москва, Россия), содержащий 22.5 мг цинка и 18 мг железа на кг. Мыши имели свободный доступ к еде и питьевой воде *ad libitum*. Световой режим день/ночь был установлен по 12 ч, температура в помещении – 22 °С.

Клеточные культуры. Культура клеток гепатомы 22a (МН-22a/МГ-22a) была получена из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Великобритания), 0.1 мг/мл гентамицина (Биолот, Россия) и 0.6 мг/мл глутамина (Биолот, Россия) при 5% CO₂ и 37 °С.

Опухолевая модель. Для получения солидных опухолей животным подкожно инокулировали в область спины 2×10^5 живых клеток гепатомы 22a в 0.2 мл забуференного физиологического раствора (PBS, Биолот, Россия). Контрольные животные получали инъекцию только PBS (группа С, Control на рисунках). Для изучения действия цинка животные с опухолями получали *ad libitum* питьевую воду с добавлением сульфата цинка (Sigma, США) в концентрации 22 мкг/мл с первого дня после инокуляции клеток гепатомы 22a в течение всего периода эксперимента. Концентрация сульфата цинка, добавляемого к питьевой воде (22 мкг/мл), была подобрана нами ранее по эффективности восстановления содержания цинка в сыворотке крови у животных с гепатомой 22a [27]. Эта концентрация по расчетам соответствует нормальному содержанию цинка в корме и международным стандартам [28]. Таким образом, группа мышей фактически получала дозу цинка в два раза больше, чем физиологическая (с кормом и дополнительно с питьевой водой). Важно также упомянуть, что прием цинка не влиял на его концентрацию в сыворотке крови контрольных мышей без опухолей [27].

На 21-е сутки опухолевого роста животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации, извлекали органы, взвешивали и определяли в них содержание микроэлементов и ферментов. Кроме того, в отдельной группе животных с гепатомой 22a определяли также массы органов в динамике с 7-х по 35-е сутки опухолевого роста.

Определение содержания негемового железа в тканях. Концентрацию железа определяли колориметрическим методом [29] с использованием хромогенного агента феррозина (Sigma-Aldrich, США). Гомогенаты тканей приготавливали в деионизированной воде 1 : 10 (масса/объем) и смешивали с равным объемом раствора, преципитирующего белки, состоящего из 1 М HCl (Реахим, Россия) и 10% трихлоруксусной кислоты (Реахим, Россия). Пробы нагревали при 95 °С в течение 1 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 8200 g в течение 10 мин. После этого 30 мкл супернатанта смешивали с 30 мкл хромогенного субстрата, состоящего из 0.508 мМ феррозина, 1.5 М ацетата натрия (Amresco, США) и 1.5% тиогликолевой кислоты (Sigma-Aldrich, США); в контрольные пробы феррозин не добавляли. Через

30 мин оптическую плотность раствора измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра (ClarioStar, BMG Labtech, Германия) при длине волны 562 нм. Построение калибровочных кривых проводили в день эксперимента с использованием 0–20 мкг/мл железа (в виде раствора $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, США) в 0.4 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.5, в качестве стандарта.

Содержание общего цинка в тканях определяли с помощью метода атомно-абсорбционной спектрометрии. Образцы растворяли в азотной кислоте (Реахим, Россия) и проводили измерение по отношению к стандартным растворам цинка (Центр стандартных образцов и высокочистых веществ, Санкт-Петербург, Россия) с помощью спектрометра ZEEit 650P (Analytik Jena, Германия). Результат выражали в микрограммах Zn на 1 г массы сырой ткани.

Определение активности каталазы. Для оценки активности каталазы в гомогенатах органов использовали метод с регистрацией комплекса пероксида водорода с ванадатом аммония [30], адаптированный для микропланшетов. Для этого 50 мкл тканевого гомогената, разведенного в 2, 4 и 8 раз 50 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 7.0) смешивали со 100 мкл 10 мМ H_2O_2 (Реахим, Россия). После инкубации в течение 2 мин на термощейкере при 270 об/мин и 37 °C реакцию останавливали путем добавления 50 мкл хромогенного раствора, содержащего 10 мМ NH_4VO_3 (Sigma-Aldrich, США) в 0.5 М H_2SO_4 (Реахим, Россия). Оптическую плотность раствора измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра при длине волны 452 нм. Для построения калибровочной кривой 100 мкл последовательных двукратных разведений 10 мМ H_2O_2 смешивали с 50 мкл 50 мМ натриево-фосфатного буфера, pH 7.0 (вместо тканевого гомогената) и через 2 мин добавляли 50 мкл 10 мМ NH_4VO_3 в 0.5 М H_2SO_4 . После определения белка по Бредфорду (Bio-Rad, США) удельную активность каталазы в пробах выражали в микромолях поглощенной H_2O_2 в течение 1 мин на 1 мг общего белка.

Активность СОД оценивали с помощью модифицированного метода [31] с использованием 50 мкМ ресазурина (Sigma-Aldrich, США), который восстанавливался супероксидными анион-радикалами, генерируемыми 150 мкМ ксантином (Sigma-Aldrich, США) и 100 нМ ксантиноксидазой (Sigma-Aldrich, США) [32]. Для учета вклада Mn-SOD к контрольным пробам добавляли 2 мМ цианида натрия (Реахим, Россия), ингибирующего Cu, Zn-SOD. За 1 условную единицу (у.е.) СОД принимали количество фермента, которое вызывало 50%-ное понижение интенсивности флуоресценции продукта восстановления ресазурина с учетом ингибирования Cu, Zn-SOD в контрольной пробе. В пробах гомогенатов также определяли концентрацию белка по Бредфорду и рассчитывали удельную активность ферментов.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 13.0 с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние роста гепатомы 22a на массу органов. Начиная с 21-х суток после инокуляции опухолевых клеток, наблюдали прогрессивное уменьшение массы тимуса (рис. 1a) и увеличение массы селезенки (рис. 1b). Увеличение массы печени начиналось несколько позже – с 28-х суток (рис. 1c).

Для дальнейших исследований был выбран срок 21 сутки, когда уже были выражены изменения массы тимуса и селезенки, но еще не началась гепатомегалия, поэтому влияние дополнительного приема цинка на ее развитие не оценивали.

Размеры опухолей на этом сроке достигали около 15 мм в диаметре, масса опухолей составляла 1.2 ± 0.3 г. При этом масса тела мышей не изменялась и составляла 19.5 ± 0.6 г в контроле и 20.9 ± 1.4 г в группе мышей с гепатомой 22a ($n = 6$).

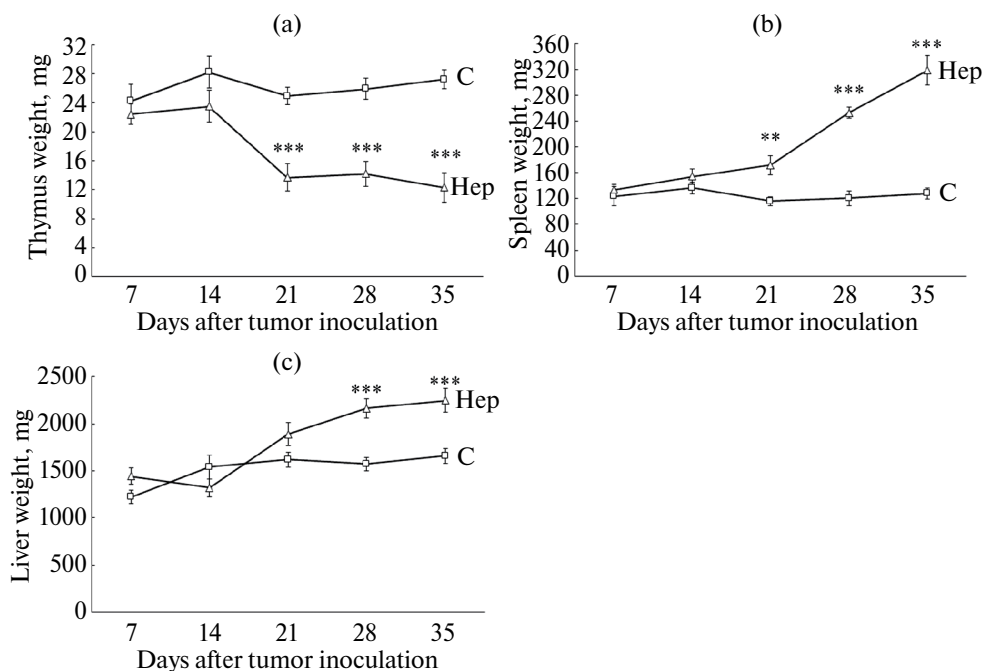


Рис. 1. Влияние опухолевого роста на массу органов.

По оси ординат: масса органов, мг, (а) – тимуса, (б) – селезенки и (с) – печени ($n = 15-20$). По оси абсцисс: дни после инокуляции опухоли, сутки. Обозначения: С (Control) – контрольные животные, Hep (Hepatoma 22a) – мыши с гепатомой 22a. Здесь и далее данные представлены в виде средней величины и ошибки среднего ($M \pm m$), звездочками обозначены достоверные различия между опухолевой (Hep) и контрольной (С) группами животных: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$.

Влияние роста гепатомы 22a и дополнительного приема сульфата цинка на содержание эндогенного цинка в органах. При исследовании содержания общего цинка в органах выявлено, что на 21-е сутки опухолевого роста этот показатель не отличался от нормы в селезенке и печени в расчете на единицу массы, но был снижен в тимусе (рис. 2a).

Поскольку на этом сроке наблюдаются выраженные изменения массы тимуса и селезенки, были также рассчитаны показатели на весь орган. Оказалось, что в печени содержание цинка на весь орган не отличается от группы контроля (рис. 2d), в селезенке повышено (рис. 2c), а в тимусе – резко снижено, почти в 4 раза (рис. 2a).

В группе мышей с опухолями, получавшими сульфат цинка, содержание эндогенного цинка в селезенке оставалось таким же, как и у животных с гепатомой, не получавших цинк (рис. 2a, c), в печени – было выше контрольного уровня и также выше, чем у мышей с гепатомой 22a (рис. 2a, d). В тимусе содержание цинка в группе мышей, получавших цинк, было в 2 раза больше, чем у животных без препарата, однако оно оставалось значительно меньше, чем у контрольных животных (рис. 2b).

Чтобы ответить на вопрос, можно ли достигнуть большей компенсации сниженного содержания цинка в тимусе путем увеличения концентрации сульфата цинка в питьевой воде, были поставлены эксперименты с концентрацией цинка – 66 мкг/мл. Как показано на рис. 3, прием сульфата цинка в этой концентрации не приводил к больше-

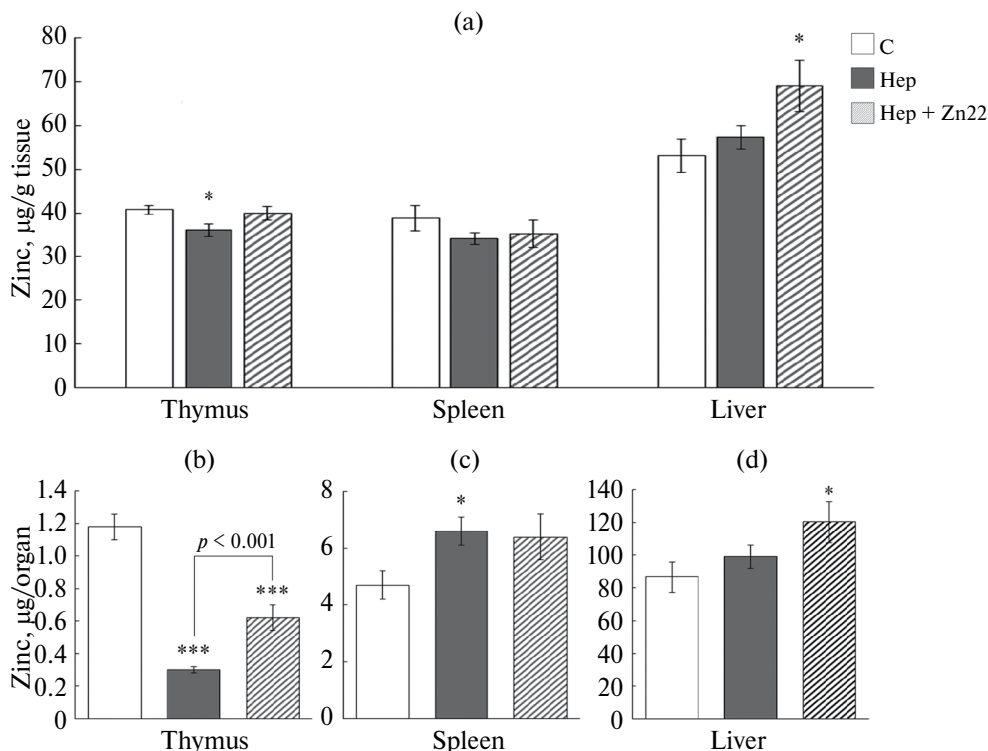


Рис. 2. Влияние опухолевого роста и приема сульфата цинка в течение 21 суток на содержание эндогенного цинка в органах. По оси ординат: (а) содержание цинка в расчете на единицу массы, $\mu\text{g/g}$ сырой ткани, (б, с, d) содержание цинка в расчете на весь орган, $\mu\text{g/organ}$. В каждой группе по 10 мышей. По оси абсцисс: группы животных. Обозначения: С (Control) – контрольные животные, Hep (Hepatoma) – мыши с гепатомой 22а, Hep+Zn22 – мыши с гепатомой 22а, получавшие сульфат цинка (22 мкг/мл с питьевой водой). Звездочками обозначены достоверные различия каждой из опытных групп по отношению к группе (С) контрольных животных.

му увеличению содержания эндогенного цинка в тимусе по сравнению с концентрацией 22 мкг/мл. Снижение концентрации сульфата цинка до 11 мкг/мл также не давало преимуществ.

Таким образом, из трех органов содержание цинка при росте гепатомы 22а было существенно снижено только в тимусе (при расчете на весь орган), и дополнительный прием цинка частично компенсировал это снижение.

Влияние роста гепатомы 22а и дополнительного приема сульфата цинка на содержание негемового железа в органах и их массу. У животных на 21-е сутки опухолевого роста было выявлено удельное снижение содержания негемового железа в печени и селезенке при расчете на единицу массы ткани (рис. 4а), и те же тенденции сохранялись при расчете на весь орган (рис. 4с, d). Изменения в тимусе при расчете на единицу массы были полностью противоположными – было выявлено повышение (рис. 4а), а при расчете на орган наблюдали выраженное снижение содержания железа (рис. 4б), хотя и не такое значительное, как уменьшение содержания другого микроэлемента – цинка (рис. 2б).

Чтобы ответить на вопрос, предшествовали ли изменения содержания железа в тимусе процессу инволюции или сопровождали его, исследовали эти показатели в динамике опухолевого роста. Повышение удельного содержания железа в тимусе начина-

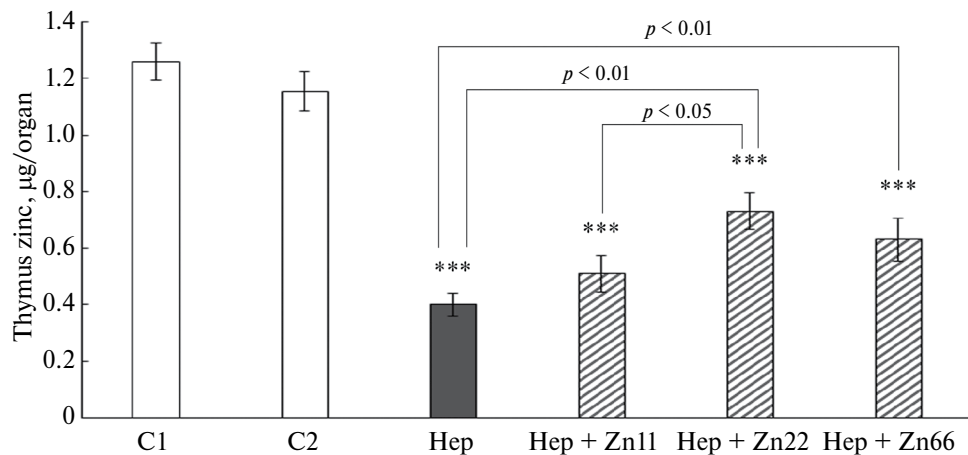


Рис. 3. Влияние разных концентраций сульфата цинка в питьевой воде на содержание эндогенного цинка в тимусе. По оси ординат: содержание эндогенного цинка в тимусе в расчете на орган, µg/organ. По оси абсцисс: группы животных C1 (Control1) – группа контрольных животных; C2 (Control2) – группа контрольных животных, получавших сульфат цинка в концентрации 22 мкг/мл в течение 21 суток; Hep (Hepatoma) – животные в гепатомой 22а; Hep+Zn11, Hep+Zn22, Hep+Zn66 – животные с гепатомой 22а, которые получали в течение 21 суток сульфат цинка в концентрациях 11, 22 и 66 мкг/мл соответственно. В каждой группе по 10 мышей. Звездочками обозначены достоверные различия между каждой из опытных групп по отношению к контрольной (C1) группе животных.

лось у животных с 21-х суток роста гепатомой 22а, так же, как и снижение содержания негемового железа на орган (рис. 5а, б). Тем самым было показано, что изменения содержания железа у мышей с опухолями не предшествовали уменьшению массы тимуса (рис. 1а), а развивались параллельно, что не позволяет нам установить причинно-следственные отношения между этими процессами. Однако при этом следует отметить, что показатели содержания железа в расчете на орган имели тенденцию к снижению по отношению к контрольному уровню на всех сроках исследования (рис. 5б).

В результате приема сульфата цинка у животных наблюдалось повышение содержания железа в селезенке и печени при расчете обоими способами (рис. 4а, с, d), а в тимусе только при расчете на весь орган (рис. 4б). При этом содержание негемового железа при расчете на орган восстанавливалось полностью до нормальных показателей в тимусе, печени и селезенке. Удельное содержание негемового железа в тимусе (при расчете на единицу массы) после приема цинка не изменялось и оставалось таким же повышенным, как и в группе мышей с гепатомой 22а, которые цинка не получали (рис. 4б).

Противоречивые результаты по содержанию железа в тимусе можно предположительно объяснить тем, что этот микроэлемент распределен в органе неравномерно и содержится в основном в стромальных клетках, а не тимоцитах [33, 34], хотя этот вопрос недостаточно изучен. При росте гепатомы 22а уменьшение массы органа происходит главным образом за счет убыли кортикальных тимоцитов [35]. Если допустить, что большая часть железа сохраняется в эпителиальных клетках и макрофагах тимуса, то при расчете на единицу массы может быть относительное повышение содержания железа, в то время как в целом органе его содержание будет снижено, например, вследствие недостаточного поступления или других причин. Мы предполагаем, что при развитии инволюции тимуса расчет содержания железа на орган будет более адекватно отражать происходящий процесс, чем на единицу массы, как это обычно принято в подобных исследованиях.

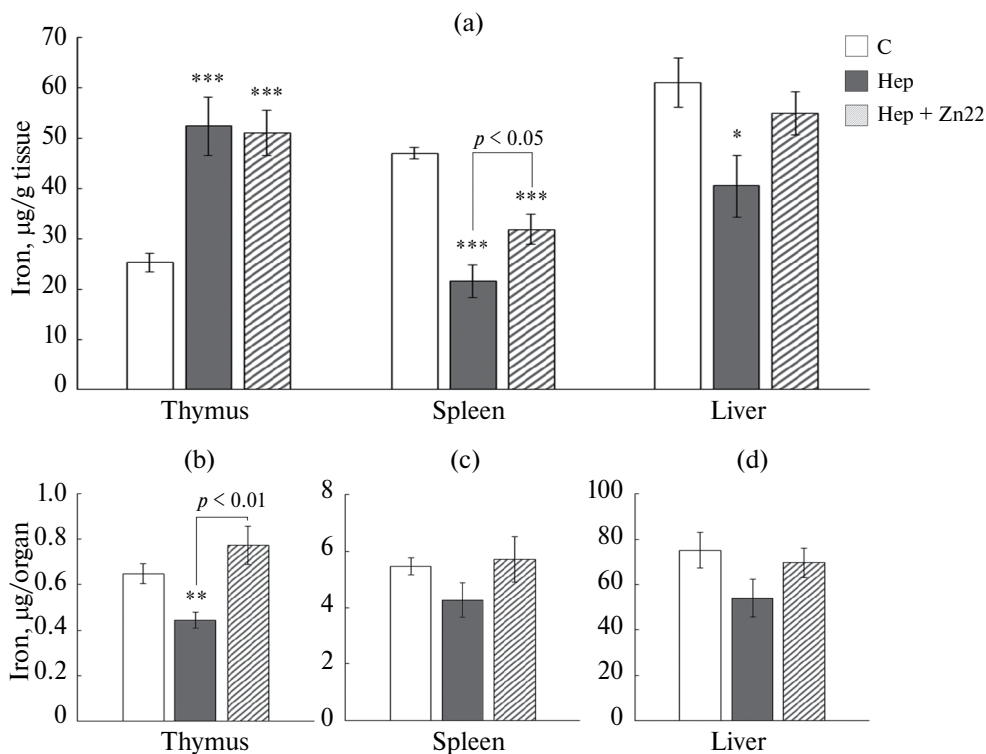


Рис. 4. Влияние опухолевого роста и приема сульфата цинка в течение 21 суток на содержание негемового железа в органах. По оси ординат: (а) содержание железа в расчете на единицу массы, $\mu\text{g/g}$ сырой ткани, (б, с, d) содержание железа в расчете на весь орган, $\mu\text{g/organ}$. В каждой группе 15–20 мышей. По оси абсцисс: группы животных. Обозначения: C (Control) – контрольные животные, Hep (Hepatoma) – мыши с гепатомой 22а, Hep+Zn22 – мыши с гепатомой 22а, получавшие сульфат цинка (22 мкг/мл с питьевой водой). Звездочками обозначены достоверные различия каждой из опытных групп по отношению к группе контрольных животных (C).

Таким образом, содержание негемового железа было снижено во всех трех органах, а с помощью сульфата цинка было достигнуто его восстановление до нормального уровня.

При исследовании влияния приема сульфата цинка на массу исследуемых органов оказалось, что это приводит к торможению развития инволюции тимуса и частичного сохранения его массы (рис. 6а), но при этом не оказывает влияния на массу селезенки и печени (рис. 6б, с).

Влияние роста гепатомы 22а и дополнительного приема сульфата цинка на активность антиоксидантных ферментов в органах. Поскольку содержание железа и цинка оказывает существенное влияние на окислительно-восстановительный потенциал в тканях, была изучена активность железосодержащего антиоксидантного фермента каталазы и цинксодержащей СОД. На 21-е сутки роста гепатомы 22а наблюдали повышение активности обоих ферментов в тимусе и снижение активности СОД в печени (рис. 7а, б). Активность каталазы в печени и активность обоих ферментов в селезенке не отличались от показателей в контрольной группе.

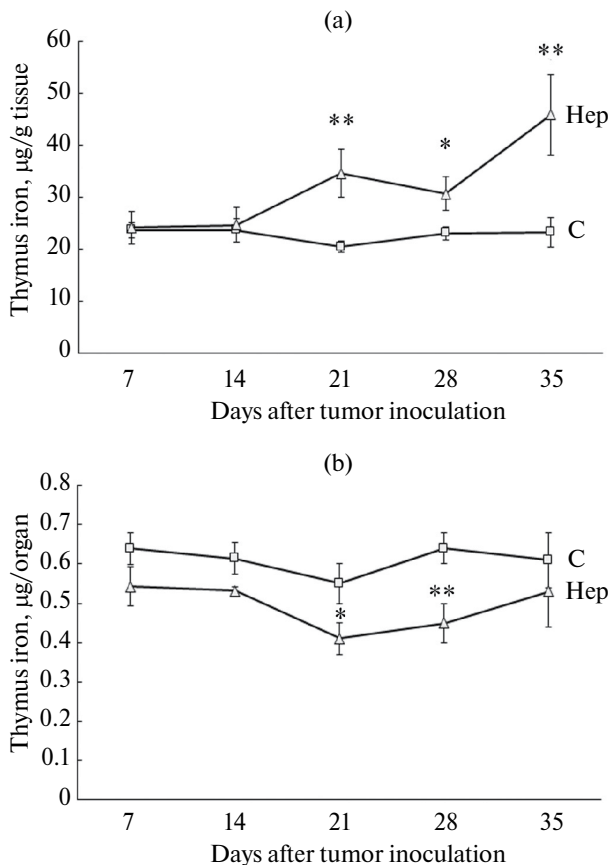


Рис. 5. Влияние опухолевого роста на содержание негемового железа в тимусе. По оси ординат: (а) содержание железа в тимусе, $\mu\text{g/g}$ сырой ткани; (б) содержание железа в тимусе в расчете на орган, $\mu\text{g/organ}$. С – у контрольных мышей и Нер – у мышей с гепатомой 22а. В каждой группе 15–20 мышей. По оси абсцисс: время после инокуляции гепатомы 22а, сутки.

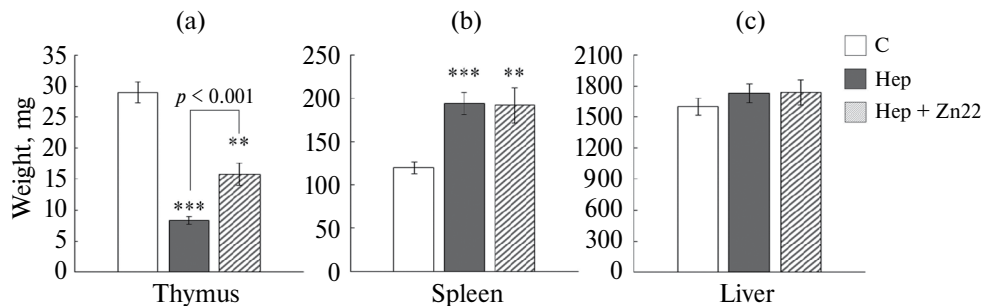


Рис. 6. Влияние опухолевого роста и приема сульфата цинка в течение 21 суток на массу органов. По оси ординат: (а) масса тимуса, мг; (б) масса селезенки, мг; (с) масса печени, мг. В каждой группе по 10 мышей. Обозначения: С (Control) – контрольные животные, Нер (Hepatoma) – мыши с гепатомой 22а, Нер+Zn22 – мыши с гепатомой 22а, получавшие сульфат цинка (22 мг/мл питьевой воды). Звездочками обозначены достоверные различия каждой из опытных групп по отношению к группе (С) контрольных животных.

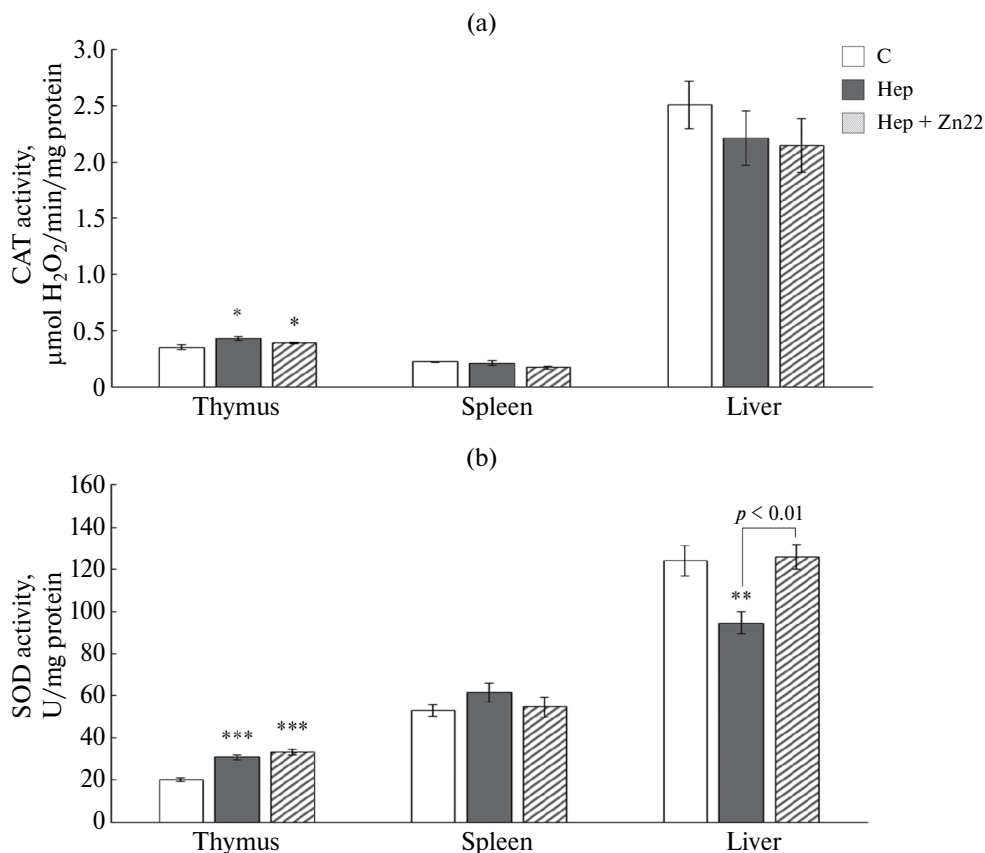


Рис. 7. Влияние опухолевого роста и приема сульфата цинка в течение 21 суток на специфическую активность антиокислительных ферментов в органах. По оси ординат: (а) – активность каталазы (CAT, catalase), μmol (мкмоль) H_2O_2 , поглощенной за 1 мин на 1 мг общего белка ($n = 10$); (б) – активность супероксиддисмутазы (SOD, superoxide dismutase), у.е. на 1 мг общего белка ($n = 10$). По оси абсцисс: группы животных, С (Control) – контрольные животные, Нер (Hepatoma) – мыши с гепатомой 22а, Нер+Zn22 – мыши с гепатомой 22а, получавшие сульфат цинка (22 мкг/мл с питьевой водой). Звездочками обозначены достоверные различия каждой из опытных групп по отношению к группе контрольных животных (С).

Применение сульфата цинка не оказывало влияния на активность ферментов в органах за исключением СОД в печени, активность которой восстанавливалась до контрольного уровня (рис. 7б), что соответствовало повышенному уровню цинка в печени у животных этой группы (рис. 2а, д).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе изучали влияние роста перевиваемой гепатомы 22а на изменения содержания цинка и негемового железа в трех удаленных от опухоли органах: тимусе, печени и селезенке. Во всех трех органах было обнаружено снижение содержания железа, а цинка – только в тимусе. На 21-е сутки опухолевого роста эти изменения сопровождались уменьшением массы тимуса, увеличением массы селезенки и отсутствием

изменений этого показателя в печени. Изучение содержания железа и цинка в тимусе животных с другими перевиваемыми опухолями, судя по доступной нам литературе, ранее не проводилось.

Для нормализации содержания металлов в органах, а также для того, чтобы установить возможную связь между их нарушениями и изменениями массы органов, эти же показатели исследовали у животных в условиях экспериментального воздействия в виде дополнительного приема сульфата цинка с питьевой водой в течение трех недель. Исследования тимуса, печени и селезенки дали разные результаты.

Нормализация содержания железа в печени и селезенке, а также повышение содержания цинка в печени у животных в группе, получавшей сульфат цинка, по сравнению с мышами-опухоленосителями, цинка не получавшими, на массу этих органов никак не повлияла. Сходные результаты были получены у крыс при росте канцероген-индуцированной опухоли молочной железы, у которых нормализация сниженного содержания железа в селезенке в результате дополнительного приема цинка не влияла на массу этого органа, которая оставалась повышенной [36].

Эти результаты и полученные нами данные позволяют сделать заключение о том, что изменения содержания железа в селезенке не связаны с ее массой и, следовательно, спленомегалия при опухолевом росте не является результатом сниженного содержания железа в этом органе.

В отличие от селезенки изменения массы тимуса при росте гепатомы 22а происходили параллельно с восстановлением содержания микроэлементов в этом органе. Нами впервые показано, что в группе животных, получавших сульфат цинка, содержание железа и цинка в тимусе (при расчете на орган) было больше по сравнению с мышами-опухоленосителями, цинк не получавшими, и это сопровождалось достоверным увеличением массы тимуса.

Впервые возможность применение цинка для сохранения массы тимуса при росте экспериментальной опухоли (карциномы Льюиса) была продемонстрирована в работе Kaiserlian с соавт. [37]. Кроме того, описан положительный результат клинического применения высоких доз цинка для восстановления функций тимуса у больных множественной миеломой после пересадки гемопоэтических стволовых клеток [38]. Данные литературы свидетельствуют о высокой клинической востребованности новых стратегий по восстановлению и сохранению функций тимуса у онкологических больных [39], у которых применение цинка может оказаться весьма перспективным.

Из возможных механизмов действия сульфата цинка у мышей с гепатомой 22а следовало, прежде всего, исключить возможность его прямого действия на опухолевый рост и опосредованное этим влияние на тимус. Как было показано нами ранее, прием сульфата цинка не оказывал влияния на размеры опухолей и выживаемость мышей [27]. Таким образом, влияние цинка на тимус не было опосредовано торможением роста самой опухоли. Аналогичные данные были получены при внутрибрюшинном введении цинка мышам с карциномой Льюиса, которое не оказывало влияния на опухолевый рост, но, так же, как и в наших исследованиях задерживало инволюцию тимуса [37].

Следует признать, что атрофия тимуса при опухолевом росте является многофакторным процессом, в котором могут быть задействованы различные механизмы с участием гормонов, цитокинов, ростовых факторов, метаболитов, продуктов опухолевого распада и др., их сочетание может варьировать в зависимости от вида опухоли [11]. Полученные нами данные впервые позволяют дополнить этот список дефицитом железа и цинка как важным элементом в развитии инволюции тимуса при опухолевом росте (рис. 8).

Коррекция дефицита цинка и железа может рассматриваться в качестве возможного механизма торможения инволюции тимуса при росте гепатомы 22а. Но это происходит лишь частично, поскольку основные причины развития инволюции тимуса, связанные с опухолевой прогрессией, не устраняются. Мы не можем свести метаболические изменения в организме, которые происходят при росте опухоли, к простому дефициту

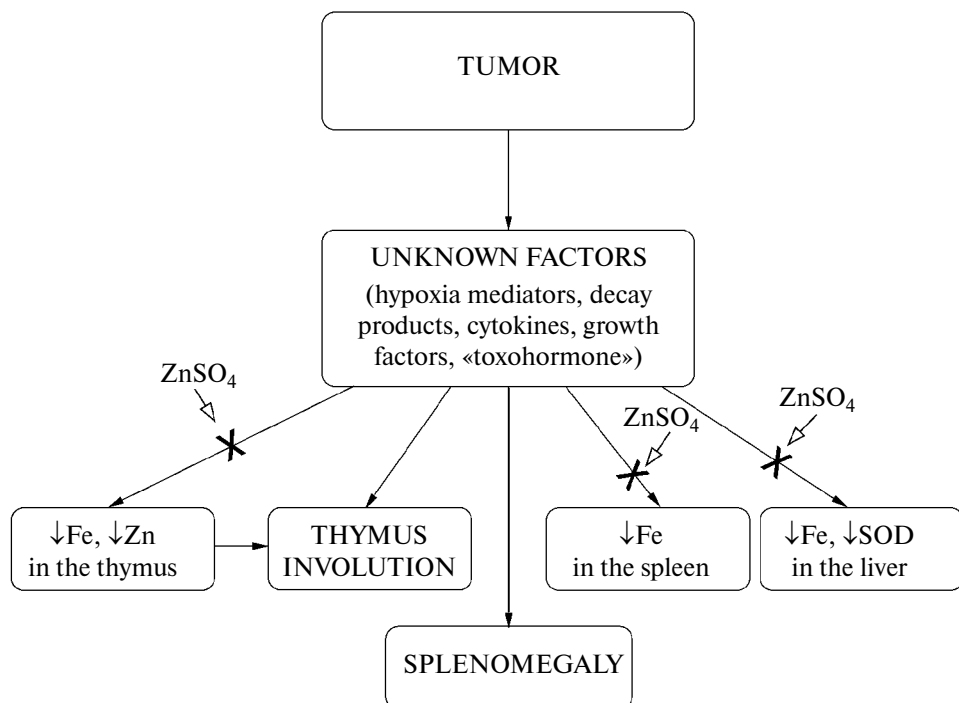


Рис. 8. Позитивные изменения, происходящие в организме животных с гепатомой 22а, в результате приема сульфата цинка в концентрации 22 мкг/мл питьевой воды в течение 21 суток. Системные изменения у мышей с гепатомой 22а, начиная с 21-х суток ее роста, включают снижение содержания негемового железа в тимусе, печени и селезенке, а также снижение содержания цинка в тимусе, которые сопровождаются развитием инволюции тимуса и спленомегалии. Кроме того, у животных с гепатомой отмечены нарушения активности антиоксидантных ферментов: повышение активности каталазы и СОД в тимусе (не показано) и снижение активности СОД в печени. Прием сульфата цинка с питьевой водой животными с гепатомой 22а препятствует снижению содержания негемового железа в тимусе, печени и селезенке и повышает содержание цинка в тимусе и печени. При этом также восстанавливается активность СОД в печени. Прием сульфата цинка тормозит развитие инволюции тимуса и не влияет на массу других органов – селезенки и печени. Обозначения: ↑ повышение, ↓ снижение.

микроэлементов, хотя это и не лишено оснований, поскольку опухолевый рост часто сопровождается анорексией, нарушением всасывания и кровотока.

Трудно определить, какой из двух микроэлементов – железо или цинк важнее для нормального функционирования вилочковой железы. Оба микроэлемента необходимы для нормальной работы любых клеток, но особенно для клеток с высокой пролиферативной активностью, какими являются лимфоциты. Это связано с тем, что цинк содержится в ДНК- и РНК-полимеразах и тимидинкиназе [10], а железо служит кофактором рибонуклеотидредуктазы – ключевого фермента для биосинтеза дезоксирибонуклеотидов [8]. Кроме того, цинк особенно важен для созревания тимоцитов, поскольку он содержится в тимусной терминальной нуклеотидилтрансферазе (TdT), участвующей в реаранжировке генов Т-клеточного рецептора (TCR). Оба металла регулируют механизмы развития клеточной смерти: цинк – апоптоза и аутофагии [9], железо – ферроптоза [40], а также оказывают существенное влияние на формирование окислительно-восстановительного потенциала тканей.

Изменения, происходящие при росте гепатомы 22а, во многом похожи на те, которые происходят в организме животных с пищевым дефицитом железа и цинка, однако имеются и существенные различия. Если рассматривать изменения массы органов, то инволюция тимуса характерна для всех трех экспериментальных моделей [12, 13, 16, 17]; спленомегалия наблюдается при росте гепатомы 22а и дефиците железа [14, 16], но не цинка, при котором отмечают гипоплазию селезенки [41] (табл. 1). Гепатомегалия сопровождается только опухолевым ростом и не развивается при дефиците этих металлов [14, 16, 42].

Таблица 1. Сравнительный анализ системных изменений, происходящих в организме животных с гепатомой 22а и животных, содержащихся на диетах с дефицитом по цинку или железу

Ткань	Параметр	Дефицит железа	Дефицит цинка	Гепатома 22а
Тимус	Масса и число клеток	↓ [15, 16]	↓ [12, 13]	↓ [27]
Селезенка	Масса	↑ [14, 16]	↓ [41]	↑
Печень	Масса	= [14, 16]	= [42]	↑
Тимус	Fe*	Нет данных	= [43] ↑ [44]	↑
	Zn*	Нет данных	= [43] = [44]	↓
Селезенка	Fe*	↓ [14]	↓ [43] ↑ [44]	↓
	Zn*	↓ [46] = [14]	= [43] ↓ [44]	=
Печень	Fe*	↓ [14, 16, 45]	= [43, 45] ↑ [44]	↓
	Zn*	= [14, 46]	↓ [43; 44]	=
Кровь	Fe	↓ [14]	↓ [43]	↓ [26]
	Zn	↓ [14]	↓ [12, 13, 43]	↓ [27]
	Глюкокортикоиды	↑ [47, 48]	↑ [12]	= [35]

Примечание: ↑ повышение, ↓ снижение, = нет изменений. * – содержание микроэлементов в органах на единицу массы.

Содержание микроэлементов в органах может значительно варьировать как при пищевом дефиците, так и при росте опухолей. В тимусе содержание металлов при пищевом дефиците железа не исследовали, а при дефиците цинка отмечали или нормальное содержание железа и цинка [43] или повышение содержания железа на единицу массы [44], как и при росте гепатомы 22а. К сожалению, в этих работах массу тимуса не определяли.

В печени и селезенке при пищевом дефиците железа содержание железа снижается [14, 16, 45], что может не сопровождаться изменениями содержания цинка в этих органах [14, 46].

В печени и селезенке при пищевом дефиците цинка содержание железа снижается [43, 44] и наблюдаются разные показатели содержания железа – повышение в печени и селезенке [44], отсутствие изменений в печени [43, 45] и снижение в селезенке [43].

При росте гепатомы 22а данные по содержанию двух микроэлементов в печени и селезенке в большей степени соответствуют изменениям при дефиците железа, чем цинка.

В крови уровни содержания железа и цинка в значительной степени влияют друг на друга – при пищевом дефиците железа гипохромия сопровождается гипохромией [14], а для дефицита цинка также характерно снижение содержания обоих металлов в циркуляции [43]. Как показано нами ранее, при росте гепатомы 22а концентрации и цинка, и железа в крови снижены [26, 27].

По данным литературы, существенным отличием дефицита цинка от дефицита железа является усиление апоптоза тимоцитов, которое связывают с подъемом концентрации глюкокортикоидов в крови [12, 13]. При дефиците железа апоптоз тимоцитов не усиливается [15], хотя повышение концентрации гормонов надпочечников в циркуляции тоже возможно [47, 48]. Рост гепатомы 22а, как и пищевой дефицит цинка, сопровождается усилением апоптоза тимоцитов, однако при этом концентрация кортикостерона в плазме мышей не отличается от контрольного уровня [35].

Если суммировать все данные и оценить, какие явления преобладают в организме мышей с гепатомой 22а – похожие в большей степени на дефицит цинка или железа, то окажется, что сходства и различия распределяются примерно поровну. Возможно, что изменения протекают по смешанному варианту. Из этих двух металлов лимитирующим фактором является цинк, поскольку в расчете на орган содержание негемового железа в тимусе мышей с гепатомой 22а посредством приема сульфата цинка нормализовалось полностью, а содержание цинка удалось сохранить лишь частично, так же как и массу тимуса. При этом дальнейшее повышение концентрации принимаемого животными сульфата цинка положительного эффекта не давало.

Между обменом железа и цинка в организме существует тесная взаимосвязь на уровне всасывания, транспорта, активности регуляторных белков и формирования запасов [1]. Неудивительно, что препараты цинка применяли для лечения железодефицитной анемии. Однако между цинком и железом существуют не только синергические, но и антагонистические взаимоотношения, например, при их совместном применении, и результат во многом определяется их концентрациями и соотношением [1]. В наших экспериментах концентрация сульфата цинка 22 мкг/мл оказалась достаточно эффективной, чтобы позитивно воздействовать на содержание железа в органах мышей. Полученные нами данные подтверждают возможность использования цинка для восстановления сниженного содержания железа в печени и селезенке, показанную у животных при росте других опухолей [36].

В работе также оценивали возможное антиоксидантное действие сульфата цинка в организме мышей с гепатомой 22а. Дефицит как цинка [20], так и железа [5, 8] может способствовать развитию окислительного стресса, в частности, из-за того, что эти микроэлементы необходимы для функционирования антиоксидантных ферментов.

Известно, что в самой опухолевой ткани повышена продукция АФК, что приводит к развитию окислительного стресса [49]. Считается, что внеклеточные АФК не только способствуют росту основного опухолевого узла *in situ*, но также могут участвовать в подготовке отдаленных тканей к метастазированию. Развитие оксидативного стресса сопровождается рост практически всех опухолей. Высокие уровни АФК вызывают неспецифические повреждения ДНК, белков и липидов. В крови больных с новообразованиями различных локализаций регистрируется повышенное содержание продуктов перекисидации липидов и снижение активности антиокислительных ферментов [21].

Повышение содержания продуктов перекисидации липидов в плазме крови показано также и у животных с экспериментальными опухолями [4, 50]. Внутривентриальное введение цинка подавляет развитие системного оксидативного стресса в организме опухоленосителей и снижает содержание малонового диальдегида в плазме крыс с канцероген-индуцированными опухолями молочных желез [4].

Признаки окислительного стресса обнаруживаются не только в циркуляции, но и в удаленных от опухоли нормальных органах. Показано повышение содержания малонового диальдегида в печени, а также наличие дисбаланса в работе ферментов антиоксидантной системы в печени и селезенке при развитии канцероген-индуцированных опухолей передней стенки желудка у мышей [22]. Обнаружено повышение содержания АФК и продуктов перекисидации липидов в печени и тимусе при росте карциномы Эрлиха [23, 24].

В настоящей работе были выявлены изменения в антиоксидантной защите тимуса и печени, что подтверждает данные литературы и в целом концепцию о развитии системного окислительного стресса при опухолевом росте. В тимусе обнаружено повышение активности каталазы и СОД, в печени – снижение активности СОД, в селезенке – отсутствие изменений. Прием сульфата цинка животными с опухолями не влиял на активность ферментов в тимусе (они оставались повышенными по сравнению с контролем) и селезенке, но восстанавливал активность СОД в печени.

На основании этих данных можно заключить, что прием сульфата цинка положительно влияет на антиоксидантную систему печени у животных с гепатомой 22а. При этом тормозящее действие цинка на развитие инволюции тимуса не связано с активностью каталазы и СОД в этом органе.

Таким образом, впервые показано, что инволюция тимуса при росте гепатомы 22а связана с дефицитом железа и цинка, а спленомегалия – не связана. Прием сульфата цинка с питьевой водой тормозит развитие инволюции тимуса и восстанавливает дефицит цинка и железа в этом органе. Кроме тимуса, прием сульфата цинка повышает содержание железа и в других органах – селезенке и печени, а также восстанавливает сниженную активность СОД в печени (рис. 8). В целом прием сульфата цинка оказывает позитивное влияние на метаболизм двух важнейших микроэлементов – железа и цинка в организме животных с гепатомой 22а и способствует сохранению тимуса, необходимого, как известно, для полноценной работы иммунной системы и защиты от инфекций.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. П. К.), сбор данных (Е. А. З., Ф. С. Е., Д. Н. М.), обработка данных (Е. А. З., К. В. Р.), написание и редактирование рукописи (Е. П. К., А. В. С., Е. А. З.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета исследований по плановой теме НИР Института экспериментальной медицины FGWG-2022–0005 (рег. № 122020300186–5). 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 экспериментальной медицины, протокол № 1/21 от 28.01.2021 г.

Наблюдение за животными до их гибели при прогрессировании опухолевого процесса проводилось с соблюдением гуманных критериев, применяемых в экспериментальной онкологии [51].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bjørklund G, Aaseth J, Skalny AV, Suliburska J, Skalnaya MG, Nikonorov AA, Tinkov AA (2017) Interactions of iron with manganese, zinc, chromium, and selenium as related to prophylaxis and treatment of iron deficiency. *J Trace Elem Med Biol* 41: 41–53.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.02.005>
2. Cunzhi H, Jiexian J, Xianwen Z, Jingang G, Shumin Z, Lili D (2003) Serum and tissue levels of six trace elements and copper/zinc ratio in patients with cervical cancer and uterine myoma. *Biol Trace Elem Res* 94(2): 113–122.
<https://doi.org/10.1385/BTER:94:2:113>
3. Idriss ME, Modawe GA, Shrif NE (2015) Assessment of serum zinc and iron among Sudanese women with breast cancer in Khartoum State. *Int J Appl Sci Res Rev* 2(2): 074–078.
4. Gulbahce-Mutlu E, Baltaci SB, Menevse E, Mogulkoc R, Baltaci AK (2021) The effect of zinc and melatonin administration on lipid peroxidation, IL-6 Levels, and element metabolism in DMBA-induced breast cancer in rats. *Biol Trace Elem Res* 199(3): 1044–1051.
<https://doi.org/10.1007/s12011-020-02238-0>
5. Aksan A, Farrag K, Aksan S, Schroeder O, Stein J (2021) Flipside of the coin: iron deficiency and colorectal cancer. *Front Immunol* 12: 635899.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635899>
6. Hoang BX, Han B, Shaw DG, Nimni M (2016) Zinc as a possible preventive and therapeutic agent in pancreatic, prostate, and breast cancer. *Eur J Cancer Prevent* 25(5): 457–461.
<https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000194>
7. Gelbard A (2022) Zinc in cancer therapy revisited. *Isr Med Assoc J* 24(4): 258–262.
8. Zohora F, Bidad K, Pourpak Z, Moin M (2018). Biological and immunological aspects of iron deficiency anemia in cancer development: a narrative review. *Nutr Cancer* 70(4): 546–556.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1460685>
9. John E, Laskow TC, Buchser WJ, Pitt BR, Basse PH, Butterfield LH, Kalinski P, Lotze MT (2010) Zinc in innate and adaptive tumor immunity. *J Transl Med* 8: 118.
<https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-118>
10. Haase H, Rink L (2014) Zinc signals and immune function. *Bio-Factors* 40: 27–40.
<https://doi.org/10.1002/biof.1114>
11. Carrio R, Lopez DM (2013) Insights into thymic involution in tumor-bearing mice. *Immunol Res* 57(1–3): 106–114.
<https://doi.org/10.1007/s12026-013-8446-3>
12. King LE, Frentzel JW, Mann JJ, Fraker PJ (2005) Chronic zinc deficiency in mice disrupted T cell lymphopoiesis and erythropoiesis while B cell lymphopoiesis and myelopoiesis were maintained. *J Am College Nutr* 24(6): 494–502.
<https://doi.org/10.1080/07315724.2005.10719495>
13. Kido T, Suka M, Yanagisawa H (2022) Effectiveness of interleukin-4 administration or zinc supplementation in improving zinc deficiency-associated thymic atrophy and fatty degeneration and in normalizing T cell maturation process. *Immunology* 165(4): 445–459.
<https://doi.org/10.1111/imm.13452>
14. Yokoi K, Kimura M, Itokawa Y (1991) Effect of dietary iron deficiency on mineral levels in tissues of rats. *Biol Trace Elem Res* 29(3): 257–265.
<https://doi.org/10.1007/BF03032682>

15. *Kuvibidila SR, Porretta C, Baliga BS, Leiva LE* (2001) Reduced thymocyte proliferation but not increased apoptosis as a possible cause of thymus atrophy in iron-deficient mice. *Br J Nutr* 86: 157–162.
<https://doi.org/10.1079/BJN2001366>
16. *Kuvibidila SR, Velez M, Gardner R, Penugonda K, Chandra LC, Yu L* (2012) Iron deficiency reduces serum and in vitro secretion of interleukin-4 in mice independent of altered spleen cell proliferation. *Nutr Res* 32(2): 107–115.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.12.005>
17. *Mocchegiani E, Romeo J, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Diaz LE, Marcos A* (2013) Zinc: dietar y intake and impact of supplementation on immune function in elderly. *Age (Dordr)* 35(3): 839–860.
<https://doi.org/10.1007/s11357-011-9377-3>
18. *Nakahara W, Fukuoka F* (1958) The newer concept of cancer toxin. *Adv Cancer Res* 5: 157–177.
[https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60411-x](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60411-x)
19. *Rubin H* (2003) Cancer cachexia: its correlations and causes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5384–5389.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0931260100>
20. *Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Mlyniec K, Librowski T* (2017) Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacology* 25: 11–24.
<https://doi.org/10.1007/s10787-017-0309-4>
21. *Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P* (2019) Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 1279250.
<https://doi.org/10.1155/2019/1279250>
22. *Gagandeep, Rao AR., Kale RK* (2005) Oxidative stress in tumour-bearing fore-stomach and distant normal organs of Swiss albino mice. *Indian J Biochem Biophys* 42(4): 216–221. PMID: 23923544
23. *Bhattacharyya A, Mandal D, Lahiry L, Bhattacharyya S, Chattopadhyay S, Ghosh UK, Sa G, Das T* (2007) Black tea-induced amelioration of hepatic oxidative stress through antioxidative activity in EAC-bearing mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 26(4): 245–254.
<https://doi.org/10.1615/jenvirpatholtoxiconcol.v26.i4.10>
24. *Mandal D, Lahiry L, Bhattacharyya A, Chattopadhyay S, Siddiqi M, Sa G, Das T* (2005) Black tea protects thymocytes in tumor-bearing animals by differential regulation of intracellular ROS in tumor cells and thymocytes. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 24(2): 91–104.
<https://doi.org/10.1615/jenvpathtoxiconcol.v24.i2.30>
25. *Barbouti A, Vasileiou PVS, Evangelou K, Vlasis KG, Papoudou-Bai A, Gorgoulis VG, Kanavaros P* (2020) Implications of oxidative stress and cellular senescence in age-related thymus involution. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 7986071.
<https://doi.org/10.1155/2020/7986071>
26. *Zelenskiy EA, Rutto KV, Kudryavtsev IV, Sokolov AV, Kisseleva EP* (2021) Iron content and cellular proliferation in thymus and spleen of hepatoma 22A bearing mice. *Cell Tissue Biol* 15(4): 393–401.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X21040118>
27. *Зеленский ЕА, Рутто КВ, Соколов АВ, Киселева ЕП* (2021) Прием цинка тормозит развитие инволюции тимуса при опухолевом росте у мышей. *Вопр онкол* 67(3): 436–441. [*Zelenskiy EA, Rutto KV, Sokolov AV, Kisseleva EP* (2021) Zinc supplementation prevents the development of thymic involution induced by tumor growth in mice. *Vopr onkol* 67(3): 436–441. (In Russ)].
<https://doi.org/10.37469/0507-3758-2021-67-3-436-441>
28. *Mocchegiani E, Santarelli L, Muzzioli M, Fabris N* (1995) Reversibility of the thymus involution and of age-related peripheral immune dysfunction by zinc supplementation in old mice. *Int J Immunopharmacol* 17(9): 703–718.
[https://doi.org/10.1016/0192-0561\(95\)00059-b](https://doi.org/10.1016/0192-0561(95)00059-b)
29. *Rebouche CJ, Wilcox CL, Widness JA* (2004) Microanalysis of non-heme iron in animal tissues. *J Biochem Biophys Methods* 58(3): 239–251.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.11.003>
30. *Hadwan MH, Ali SK* (2018) New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples. *Anal Biochem* 542: 29–33.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.013>
31. *Spitz DR, Oberley LW* (1989) An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 179(1): 8–18.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90192-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90192-9)

32. *Samygina VR, Sokolov AV, Bourenkov G, Schneider TR, Anashkin VA, Kozlov SO, Kolmakov NN, Vasilyev VB* (2017) Rat ceruloplasmin: new labile copper binding site and zinc/copper mosaic. *Metallomics* 9(12): 1828–1838.
<https://doi.org/10.1039/c7mt00157f>
33. *Vigorita VJ, Hutchins GM* (1978) The Thymus in hemochromatosis. *Am J Pathol* 93:661–666.
34. *Roberts RL, Sandra A* (1994) Transport of transferrin across the blood-thymus barrier in young rats. *Tissue and Cell* 26 (5): 757–766.
35. *Kiseleva EP, Suvorov AN, Ogurtsov RP* (1998) The role of apoptosis in the thymic involution during growth of the syngeneic transplanted tumor in mice. *Biol Bull* 25(2): 129–135.
36. *Skrzynowska D, Korczak BB, Tokarz A, Kazimierzczuk A, Klepacz M, Makowska J, Gadzinski B* (2015) The effect of zinc and phytoestrogen supplementation on the changes in mineral content of the femur of rats with chemically induced mammary carcinogenesis. *J Trace Elem Med Biol* 32: 79–85.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2015.06.004>
37. *Kaiserlian D, Savino W, Dardenne M* (1983) Studies of the thymus in mice bearing the Lewis lung carcinoma. II. Modulation of thymic natural killer activity by thymulin (FTS-Zn) and the antimetastatic effect of zinc. *Clin Immunol Immunopathol* 28: 192–204.
[https://doi.org/10.1016/0090-1229\(83\)90154-x](https://doi.org/10.1016/0090-1229(83)90154-x)
38. *Iovino L, Mazziotta F, Carulli G, Guerrini F, Morganti R, Mazzotti V, Maggi F, Macera L, Orciuolo E, Buda G, Benedetti E, Caracciolo F, Galimberti S, Pistello M, Petrini M* (2018) High-dose zinc oral supplementation after stem cell transplantation causes an increase of TRECs and CD4⁺ naïve lymphocytes and prevents TTV reactivation. *Leuk Res* 70: 20–24.
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.04.016>
39. *Cardinale A, De Luca CD, Locatelli F, Velardi E* (2021) Thymic function and T-cell receptor repertoire diversity: implications for patient response to checkpoint blockade immunotherapy. *Front Immunol* 12: 752042.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.752042>
40. *Zhou L, Zhao B, Zhang L, Wang S, Dong D, Lv H, Shang P* (2018) Alterations in cellular iron metabolism provide more therapeutic opportunities for cancer. *Int J Mol Sci* 19(5): 1545.
<https://doi.org/10.3390/ijms19051545>
41. *King LE, Fraker PJ* (1991) Flow cytometric analysis of the phenotypic distribution of splenic lymphocytes in zinc-deficient adult mice. *J Nutr* 121(9): 1433–1438.
<https://doi.org/10.1093/jn/121.9.1433>
42. *Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS* (1979) Altered thymic structure and mitogen responsiveness in postnatally zinc-deprived mice. *Dev Comp Immunol* 3(4): 725–738.
[https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(79\)80065-8](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(79)80065-8)
43. *Cox DH, Schlicker SA, Chu RC* (1969) Excess dietary zinc for the maternal rat, and zinc, iron, copper, calcium, and magnesium content and enzyme activity in maternal and fetal tissues. *J Nutr* 98(4): 459–466.
<https://doi.org/10.1093/jn/98.4.459>
44. *Keen CL, Reinstein NH, Goudey-Lefevre J, Lefevre M, Lönnerdal B, Schneeman BO, Hurley LS* (1985) Effect of dietary copper and zinc levels on tissue copper, zinc, and iron in male rats. *Biol Trace Elem Res* 8(2): 123–136.
<https://doi.org/10.1007/BF02917466>
45. *Klecha AJ., Salgueiro J, Wald M, Boccio J, Zubillaga M, Leonardi NM, Gorelik G, Cremaschi GA* (2005) In vivo iron and zinc deficiency diminished T- and B-selective mitogen stimulation of murine lymphoid cells through protein kinase C-mediated mechanism. *Biol Trace Elem Res* 104(2): 173–183.
<https://doi.org/10.1385/BTER:104:2:173>
46. *Staniek H* (2019) The combined effects of Cr(III) supplementation and iron deficiency on the copper and zinc status in Wistar rats. *Biol Trace Elem Res* 190(2): 414–424.
<https://doi.org/10.1007/s12011-018-1568-7>
47. *Campos MS, Barrionuevo M, Alferez MJ, Gómez-Ayala AE, Rodríguez-Matas MC, Lopez Aliaga I, Lisbona F* (1998) Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in the nutritionally iron-deficient rat. *Exp Physiol* 83(6): 771–781.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1998.sp004158>
48. *Ranade SC, Nawaz S, Chakrabarti A, Gressens P, Mani S* (2013) Spatial memory deficits in maternal iron deficiency paradigms are associated with altered glucocorticoid levels. *Horm Behav* 64(1): 26–36.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.04.005>
49. *Liao Z, Chua D, Tan NS* (2019) Reactive oxygen species: a volatile driver of field cancerization and metastasis. *Mol Cancer* 18: 65.
<https://doi.org/10.1186/s12943-019-0961-y>

50. *Rajendran J, Pachaiappan P, Subramaniyan S* (2019) Dose-dependent chemopreventive effects of citronellol in DMBA-induced breast cancer among rats. *Drug Dev Res* 80(6): 867–876.
<https://doi.org/10.1002/ddr.21570>
51. *Wallace J* (2000) Humane endpoints and cancer research. *ILAR J* 41(2): 87–93.
<https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.87>

Alterations in Tissue Content of Iron and Zinc in Mice Bearing Hepatoma 22A and their Correction by Zinc Sulphate Supplementation

**E.A. Zelenskiy^a, K. V. Rutto^a, A. S. Trulioff^a, D. N. Magazenkova^a, A. V. Sokolov^a,
and E. P. Kisseleva^{a, b, *}**

^a*Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia*

^b*North-Western Medical University named after II Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: ekissele@yandex.ru*

It is known that many tumors induce iron and zinc deficiency in the organism. We studied the content of these metals, as well as the specific activity of two antioxidant metal-dependent enzymes – catalase and superoxide dismutase of three distal organs (thymus, liver and spleen) in animals bearing transplantable hepatoma 22a. These alterations were compared to weight changes of organs. On day 21 of tumor growth, as compared to control group, nonheme iron content in all three organs was decreased, and zinc content – only in the thymus. The specific activities of catalase and superoxide dismutase were both increased in the thymus, while in the liver activity of superoxide dismutase decreased. At the same time point thymic involution and splenomegaly were developed. In order to normalize metal content mice bearing hepatoma 22a were supplemented with 22 mkg of zinc sulphate per ml of drinking water during 3 weeks. Zinc sulphate supplementation partly compensated zinc deficiency in the thymus, increased zinc content in the liver and restored iron content in three organs. It also normalized superoxide dismutase activity in the liver and had no influence on enzymes in other organs. Zinc supplementation did not influence the weight of spleen and liver, but prevented the development of thymic involution. Moreover, metal deficiency in the thymus was restored while the activity of antioxidant enzymes remained unchanged. Based on this we can conclude that thymus involution in hepatoma 22a mice was associated with iron and zinc deficiency in this organ and was not linked with antioxidant enzyme activity, while splenomegaly had no relation to both types of parameters in the spleen. Thus, zinc sulphate positively influences metabolism of two vital trace elements – zinc and iron in animals bearing hepatoma 22a, what contributes to maintaining of the central immune organ – the thymus, and along with this it improves antioxidant system of the liver.

Keywords: thymus involution, liver, spleen, hepatoma 22a, zinc content, iron content, zinc sulphate

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**АНАЛИЗ КОРРЕЛЯЦИЙ МЕЖДУ ПАРАМЕТРАМИ ПОВЕДЕНИЯ
В ПРИПОДНЯТОМ КРЕСТООБРАЗНОМ ЛАБИРИНТЕ И УРОВНЕМ
ИНТЕРЛЕЙКИНА-1БЕТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ У КРЫС**

© 2024 г. Н. П. Комышева*, Г. Т. Шишкина, А. И. Мухамадеева, Н. Н. Дыгало

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

**E-mail: agarina@bionet.nsc.ru*

Поступила в редакцию 21.05.2024 г.

После доработки 21.06.2024 г.

Принята к публикации 21.06.2024 г.

Периферические цитокины могут влиять на психоэмоциональное поведение, однако роль интерлейкина-1бета (ИЛ-1бета) в изменении тревожности и двигательной активности в ответ на активацию воспаления остается неясной. С целью прояснения этого вопроса у взрослых самцов крыс были проанализированы корреляции между поведенческими параметрами в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) и уровнем ИЛ-1бета в плазме крови после введения в разных режимах провоспалительного стимула липополисахарида (ЛПС). ЛПС в дозах 0.5 или 5 мг/кг, а также физиологический раствор (контроль) вводили крысам внутривенно. Наиболее выраженным поведенческим эффектом через сутки после однократной инъекции было зависимое от дозы эндотоксина угнетение двигательной активности животных. После дозы 5 мг/кг через сутки также отмечалось повышенное тревожное поведение. Поведенческие изменения, вызванные высокой дозой эндотоксина, были полностью нормализованы через неделю. Поведение животных через сутки окончания повторных инъекций ЛПС в меньшей дозе в течение недели (0.5 мг/кг; 1 раз в два дня) также не отличалось от контроля. Угнетение двигательной активности после ЛПС могло быть обусловлено увеличением уровня ИЛ-1бета в плазме крови, на что указывают выявленные достоверные отрицательные корреляции между содержанием ИЛ-1бета и соответствующими поведенческими параметрами. Между периферическим уровнем ИЛ-1бета и таким классическим показателем тревожности, как процент входов в открытые рукава лабиринта, достоверной корреляции не обнаружено. В целом полученные результаты позволяют заключить, что ИЛ-1бета является несомненным участником механизма транзиторного угнетающего влияния ЛПС на двигательную активность.

Ключевые слова: липополисахарид, провоспалительные цитокины, интерлейкин-1бета, воспаление, тревожность, двигательная активность

DOI: 10.31857/S0869813924070068, **EDN:** BDQFTD

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные данные указывают на связь периферического воспаления с развитием аффективных расстройств [1]. Наиболее убедительные результаты получены в отношении депрессии, в провоцировании которой ключевую роль отводят провоспалительным цитокинам [2–4]. Повышенные уровни этих цитокинов, среди

которых фактор некроза опухоли (ФНО) и интерлейкины 6 (ИЛ-6), 12 (ИЛ-12) и 17 (ИЛ-17А) обнаруживаются в крови пациентов с большим депрессивным расстройством [5]. Значение периферических цитокинов в развитии тревожных расстройств традиционно привлекало меньше внимания, однако выявление воспалительных процессов у пациентов с повышенной тревожностью [6, 7] обусловило рост исследований, в том числе и в модельных экспериментах на животных, выявляющих взаимоотношения между показателями тревоги и уровнями цитокинов.

В экспериментальных работах для провоцирования воспаления наиболее часто используют бактериальный эндотоксин (липополисахарид, ЛПС). Помимо иммунной активации через экспрессирующийся на поверхности макрофагов толл-подобный рецептор-4, введение эндотоксина способно также провоцировать поведенческие изменения, аналогичные клиническим симптомам депрессии у человека [8, 9]. Наиболее типичным ответом на ЛПС является снижение двигательной активности, которое однако, как полагают, отражает развитие, особенно в первые часы после введения, так называемого «болезненного» состояния (sickness), маскирующего реальные изменения аффективного поведения [10]. Поэтому минимальным сроком для исследования механизмов влияния ЛПС на поведение, в том числе и тревожность, считаются сутки после введения, когда симптомы «болезненного» состояния, включающие снижение исследовательской активности и пищевого поведения, значительно ослабевают [9].

Механизмы индукции эндотоксином поведенческих ответов могут включать увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов. В сыворотке и префронтальной коре самцов мышей через сутки после однократного введения ЛПС обнаружено увеличение уровней провоспалительных цитокинов, таких ИЛ-1бета, ИЛ-6 и ФНО-альфа [11]. Уровни цитокинов на периферии довольно быстро возвращаются к контрольным значениям, например, уровень ИЛ-1бета в плазме крови был значительно повышен через 90 мин после внутривенного введения ЛПС, а далее этот уровень быстро, в течение нескольких часов, снижался [12]. В то же время в центральной нервной системе, вызванные эндотоксином изменения могут наблюдаться значительно дольше, например, и через 26 дней после внутрижелудочкового введения [13], что объясняет повышенный интерес именно к центральным цитокинам в связи с поведенческими эффектами ЛПС [14–18].

С целью дальнейшего прояснения роли периферического ИЛ-1бета в индукции эндотоксином поведенческих изменений, ассоциируемых с тревожностью и двигательной активностью, в представленной работе были проанализированы коррелятивные отношения между значениями поведенческих параметров в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) и уровнями ИЛ-1бета в плазме крови крыс после введения ЛПС в разных дозах и режимах. Мы выбрали ПКЛ, поскольку он позволяет оценивать в одном тесте тревожное поведение, а также двигательную активность животных. К ключевым параметрам, связанным с тревожностью, относят процент входов в открытые рукава, в то время как количество входов в закрытые рукава, а также общее количество входов в рукава связывают с двигательной активностью [19, 20].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работу проводили на взрослых самцах крыс (Wistar) массой тела 200–250 г, содержащихся в виварии Института цитологии и генетики СО РАН в условиях контролируемого светового режима (14 ч свет/10 ч темнота) со свободным доступом к воде и корму.

Воспаление у крыс индуцировали внутрибрюшинным введением ЛПС (серотип O55:B5; Sigma-Aldrich, США). Было проведено два эксперимента. В первом оценивали зависимость ответов от дозы эндотоксина (0.5 или 5 мг/кг) через сутки после однократного введения. Во втором, 7-дневном эксперименте, анализировали адаптацию к повторным инъекциям (4 инъекции, 1 раз в два дня в дозе 0.5 мг/кг, исследования проводили через

сутки после последнего введения) и к однократной высокой дозе (5 мг/кг, исследовали через 7 дней). Во всех экспериментах контрольные животные получали соответствующие инъекции физиологического раствора. В каждой группе было по 6–8 животных.

ПКЛ. Тестовый аппарат ПКЛ (стандартной конфигурации) был приподнят на 65 см от пола и имел по два противоположно расположенных открытых и закрытых (со стенками высотой 40 см) рукавов, соединенных центральной площадкой (10 × 10 см). Длина рукавов – 45 см, ширина – 10 см. Животное высаживали на центральную площадку с обращением к одному и тому же открытому рукаву. Поведение животного в течение 5-минутного теста записывали с помощью видеокамеры для последующей оценки исследователями, незнакомыми с условиями эксперимента. Проанализированные поведенческие параметры представляли комбинацию исследовательского и тревожного поведения, а также общей активности животных, среди которых число входов в открытые и закрытые рукава, число вставаний на задние лапы (rears), а также продолжительность пройденного в рукавах расстояния. После каждого теста лабиринт промывался мыльной водой и просушивался бумажными полотенцами.

ИЛ-1бета. У животных после теста собирали периферическую кровь в холодные пробирки, содержащие 0.05 мл 0.25 М ЭДТА, центрифугировали при 3000 об/мин и 4 °С в течение 20 мин, затем отделяли плазму, которую хранили при –60°С до определения ИЛ-1бета иммуоферментным методом с помощью набора кат. № BMS630TEN (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Австрия) в соответствии с инструкцией производителя. Вкратце, образцы или стандарт приливали в 96-луночный планшет. Затем добавляли подготовленный биотин-конъюгат и после 120-минутной инкубации при 25 °С в каждую лунку приливали стрептавидин-конъюгат пероксидазы хрена, связывающую биотин-конъюгат. После инкубации в течение 60 мин при 25 °С в лунки добавляли раствор тетраметилбензидина до появления необходимой окраски, затем приливали стоп-раствор. Абсорбцию образцов определяли при длине волны 450 нм с помощью планшетного ИФА-ридера BIOBASE BK-EL10C (Biobase Bioindustry Shandong Co, Ltd), расчет концентрации ИЛ-1бета проводили автоматически по стандартной кривой.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных результатов проводили однофакторным дисперсионным анализом (фактор – введение ЛПС) с последующей оценкой межгрупповых различий по критерию Тьюки. При прямых сравнениях групп использовали *t*-критерий Стьюдента. Наличие корреляционных взаимоотношений оценивали по Пирсону. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поведение в тесте ПКЛ

Однофакторный дисперсионный анализ выявил значительное влияние ЛПС на процент входов в открытые рукава лабиринта (эффект ЛПС: $F_{2,18} = 3.76$; $p < 0.05$, рис. 1а). Последующие сравнения отдельных групп показали, что ЛПС в дозе 5 мг/кг достоверно снижал значение этого показателя по сравнению с контролем, что классически интерпретируется как повышение тревожно-подобного поведения. Изменение после введения ЛПС в дозе 0.5 мг/кг не достигало достоверности. Сходный, зависимый от дозы эффект, обнаружен также в отношении других ассоциированных с повышенной тревожностью параметров. Введение ЛПС в дозе 5 мг/кг уменьшало число «выглядываний» вниз с открытых рукавов (рис. 1б) и процент времени, проводимого на центральной площадке (рис. 1с). Результаты, представленные на этих рисунках, также показывают, что тревожность, повышенная через сутки после более высокой дозы, через неделю возвращалась к контрольному уровню. Тревожное поведение, оцененное в лабиринте через сутки после четырех повторных введений ЛПС в дозе 0.5 мг/кг в течение недели (1 раз в 2 дня), также не отличалось от контроля (данные не показаны).

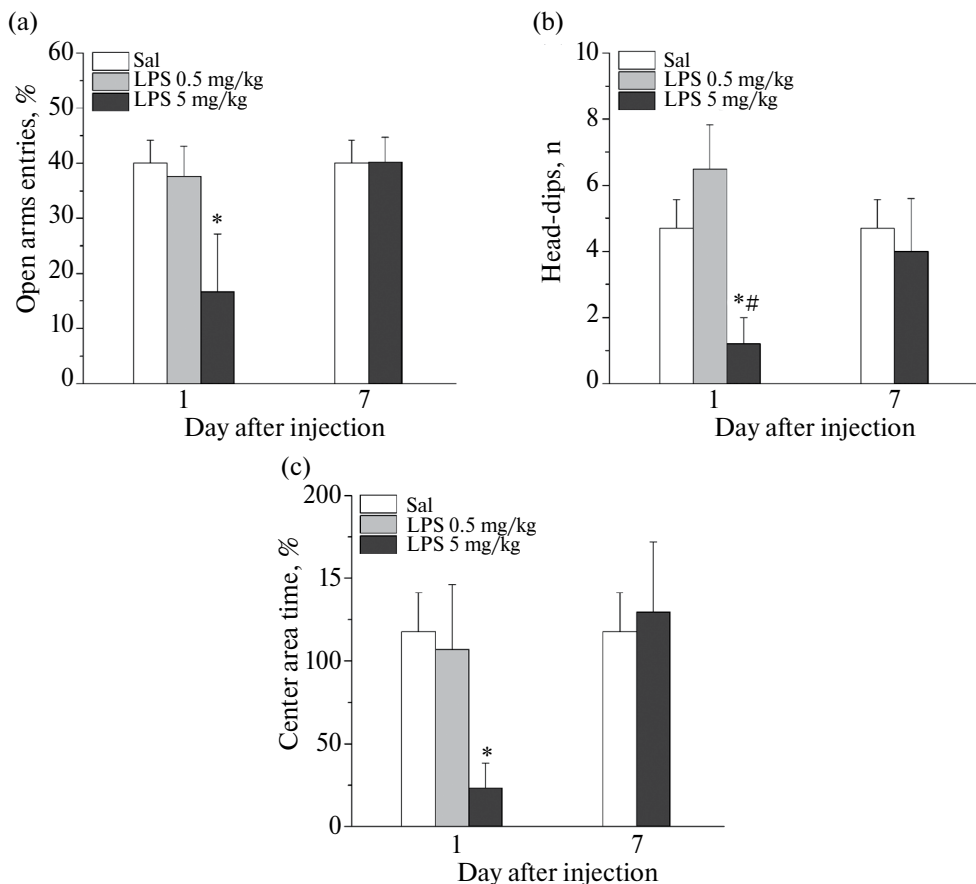


Рис. 1. Изменение параметров тревожного поведения взрослых крыс в тесте ПКЛ через 1 и 7 дней после однократного внутривбрюшинного введения ЛПС: (a) – процент входов в открытые рукава (Open arms entries, %); (b) – количество выглядываний с открытых рукавов (Head-dips, n); (c) – процент времени нахождения на центральной площадке (Center area time, %). * – $p < 0.05$ по сравнению с животными через сутки после введения физиологического раствора; # – $p < 0.05$ по сравнению с животными через сутки после введения ЛПС в дозе 0.5 мг/кг.

В тесте ПКЛ проводили также оценку двигательной активности животных. Однократное введение ЛПС, особенно в более высокой дозе, угнетало по сравнению с контролем активность, измеренную через сутки (рис. 2). После введения эндотоксина в дозе 5 мг/кг животные демонстрировали достоверное уменьшение общего числа входов в открытые и закрытые рукава (эффект ЛПС: $F_{2,18} = 3.57$; $p < 0.05$, рис. 2a), числа вставаний на задние лапы (эффект ЛПС: $F_{2,18} = 12.37$; $p < 0.001$, рис. 2b), расстояния, пройденного в закрытых рукавах (эффект ЛПС: $F_{2,18} = 7.29$; $p < 0.01$, рис. 2c) и суммарно во всех рукавах (эффект ЛПС: $F_{2,18} = 7.53$; $p < 0.01$, рис. 2d). Снижение двигательной активности, обнаруженное через сутки после введения эндотоксина, нормализовалось к 7-му дню.

Двигательная активность животных, оцененная через сутки после повторных введений ЛПС в дозе 0.5 мг/кг в течение недели (1 раз в 2 дня, 4 инъекции), не отличалась от контроля (данные не показаны).

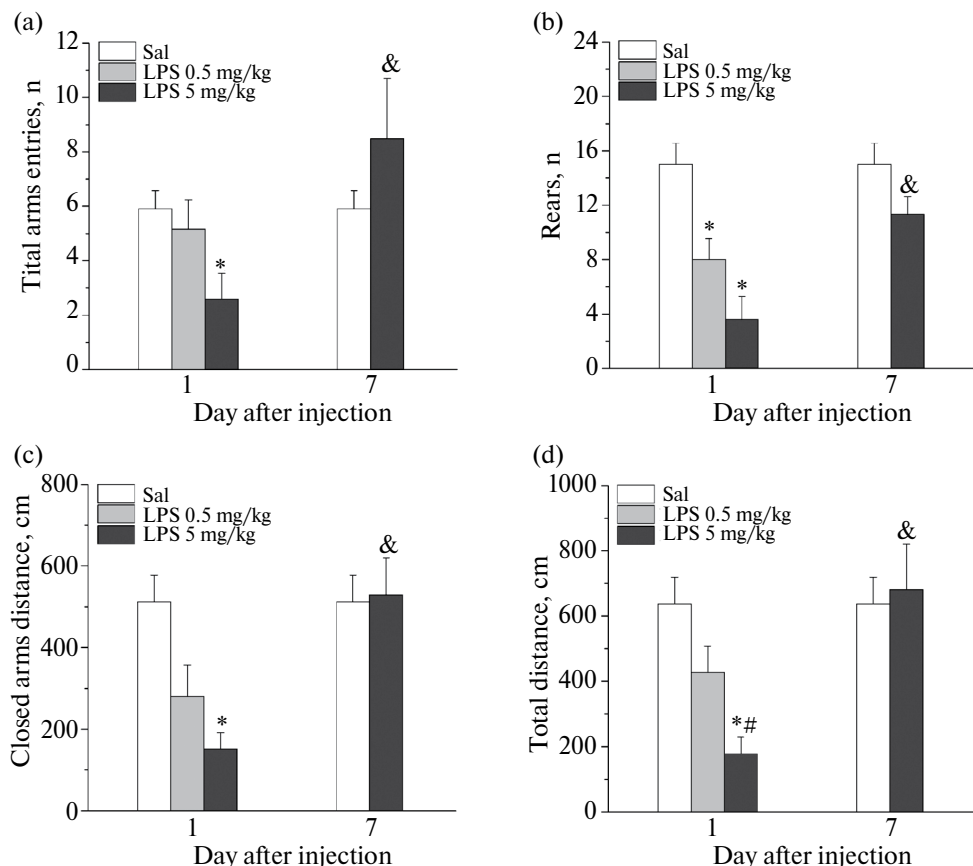


Рис. 2. Изменение параметров двигательной активности взрослых крыс в тесте ПКЛ через 1 и 7 дней после однократного внутрибрюшинного введения ЛПС: (а) – общее число входов в открытые и закрытые рукава (Total arms entries, n); (б) – число вставаний на задние лапы (Rears, n); (с) – пройденное расстояние в закрытых рукавах (Closed arms distance, cm); (д) – общее пройденное расстояние в открытых и закрытых рукавах (Total distance, cm). * – $p < 0.05$ по сравнению с животными через сутки после введения физиологического раствора; # – $p < 0.05$ по сравнению с животными через сутки после введения ЛПС в дозе 0.5 мг/кг; & – $p < 0.05$ по сравнению с животными через сутки после введения ЛПС в дозе 5 мг/кг.

Уровень ИЛ-1бета в плазме крови

На рис. 3 представлено, что уровень ИЛ-1бета в крови животных через сутки после однократного введения ЛПС как в низкой, так и в высокой дозе был достоверно увеличен (эффект ЛПС: $F_{2,18} = 14.22$; $p < 0.001$). Этот повышенный уровень полностью нормализовался в течение последующей недели (на рисунке проиллюстрировано для более высокой дозы). Уровень цитокина через сутки после повторных введений ЛПС в дозе 0.5 мг/кг в течение недели (1 раз в 2 дня; 4 инъекции) не отличался от контроля (данные не показаны).

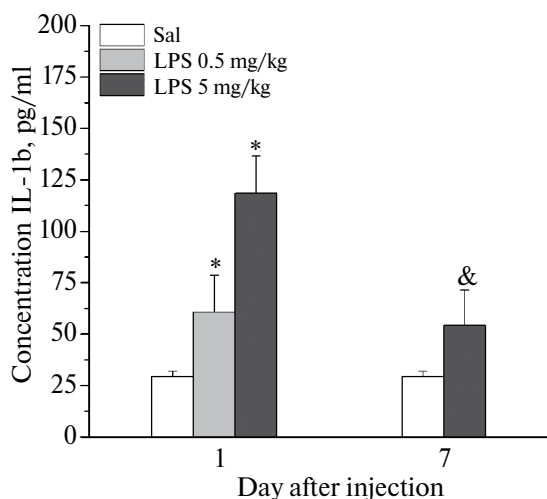


Рис. 3. Изменение уровня ИЛ-1бета в плазме крови крыс через 1 и 7 дней после однократного внутрибрюшинного введения ЛПС. * – $p < 0.05$ по сравнению с животными через сутки после введения физиологического раствора; & – $p < 0.05$ по сравнению с животными через сутки после введения ЛПС в дозе 5 мг/кг.

Корреляции между поведенческими параметрами и уровнями ИЛ-1бета в плазме крови

Увеличенные уровни ИЛ-1бета могут вовлекаться в повышение тревожности и угнетение двигательной активности животных после введения ЛПС. Проведенный корреляционный анализ выявил наличие достоверной отрицательной корреляции между уровнями ИЛ-1бета и значениями параметров, ассоциированных с двигательной активностью: с числом вставаний на задние лапы ($r = -0.73$; рис. 4а), с продолжительностью пройденного расстояния в закрытых ($r = -0.58$; рис. 4б) и суммарно в открытых и закрытых ($r = -0.49$; рис. 4с) рукавах. Вместе с тем корреляции между уровнями ИЛ-1бета и значениями параметров, ассоциированных с тревожностью и включающих процент входов в открытые рукава ($r = -0.31$; рис. 4д), не достигали достоверности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Новым результатом, полученным в работе, является выявленное свидетельство корреляционной взаимосвязи сниженной двигательной активности животных с повышенным уровнем провоспалительного цитокина ИЛ-1бета в крови через сутки после введения ЛПС. Минимальный использованный для исследования в работе срок после введения эндотоксина – сутки, позволяет избежать маскирующего изменение аффективного поведения «болезненным» состоянием, развивающимся в первые часы после воздействия [9], и способствует отделению влияния ЛПС на двигательную активность от влияния на тревожное поведение. Например, связываемое с увеличением периферического уровня ИЛ-1бета уменьшение числа входов в открытые рукава через 2 ч после введения ЛПС в дозе 5 мг/кг, но не 1 мг/кг, полагают, обусловлено угнетением общей двигательной активности [10]. Впервые проведенный корреляционный анализ между значениями поведенческих параметров и периферическими уровнями ИЛ-1бета показал наличие достоверных отрицательных корреляций для показателей двигательной активности и отсутствие каких-либо корреляций для тревожного поведения.

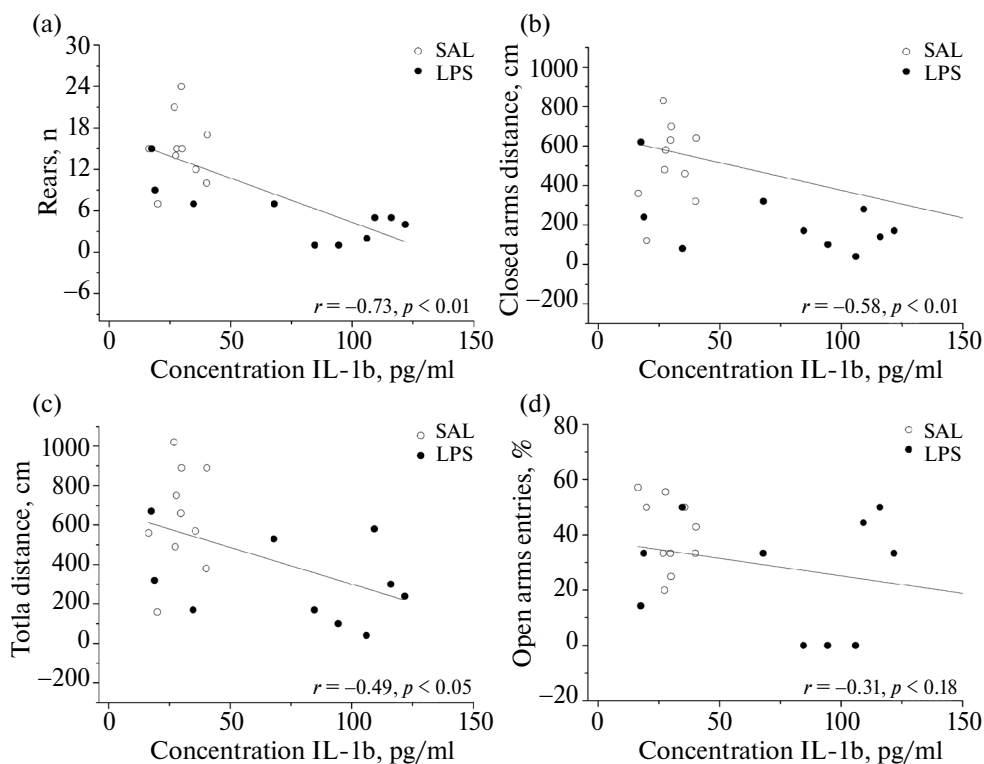


Рис. 4. Корреляции между уровнями ИЛ-1бета в плазме крови и поведенческими параметрами в тесте ПКЛ через сутки после введения ЛПС: (а) – числом вставаний на задние лапы; (б) – пройденным расстоянием в закрытых рукавах; (с) – общим пройденным расстоянием в открытых и закрытых рукавах; (д) – процентом входов в открытый рукав.

В нашей работе повышение тревожности наблюдалось через сутки после системного введения ЛПС в дозе 5 мг/кг, что согласуется с результатами теста ПКЛ в эти сроки у мышей после введения эндотоксина в дозе 1 мг/кг [15], 0.8 мг/кг [17] или 0.83 мг/кг [16]. В наших исследованиях изменений показателей тревожности не обнаружено через 24 ч после введения ЛПС в меньшей дозе – 0.5 мг/кг. Исследование зависимости ответа тревожного поведения от дозы вводимого эндотоксина обычно проводили в первые несколько часов после введения. И если через 2 ч все дозы ЛПС (0.25, 0.5 и 1 мг/кг) достоверно снижали у крыс процент входов в открытые рукава [21], то через 3 ч такой эффект был обнаружен от дозы 0.5 мг/кг, но не 0.01, 0.05 или 0.2 мг/кг [22]. Изменения тревожного поведения через 2 и 3 ч после дозы 0.5 мг/кг, в отличие от отсутствия эффекта от такой дозы в нашем исследовании, проведенном через сутки, очевидно, связано с развитием «болезненного» состояния в первые часы после введения.

Хотя длительные, в течение двух и более недель, повторные введения ЛПС в неэффективной через сутки дозе в 0.5 мг/кг приводили к стойкому увеличению тревожности [23, 24], применение менее продолжительных, всего в течение недели, повторных введений эндотоксина в этой же дозе не повлияло на тревожное поведение животных, оцененное через сутки после последнего введения. Сходное отсутствие различий по уровню тревож-

ности между контрольными животными и животными, получавшими ежедневные в течение четырех дней инъекции ЛПС в дозе 1 мг/кг, через сутки после последнего введения было обнаружено ранее в тесте темно-светлая камера (light-dark test) [25]. Отсутствие поведенческих эффектов после повторяющихся введений эндотоксина может быть результатом развития к нему резистентности, например, за счет обнаруженного ранее адаптивного увеличения экспрессии мозгового нейротрофического фактора BDNF и антиапоптозного белка Bcl-xl в разных отделах мозга крыс после внутрибрюшинного введения ЛПС [26].

Повышенная тревожность в тесте ПКЛ после однократного введения ЛПС отмечалась у мышей и на второй день после дозы 1 мг/кг [18]. В нашей работе поведенческие изменения у крыс после введения ЛПС в дозе 5 мг/кг были полностью нивелированы на 7-й день. Эти результаты согласуются с полученными ранее на крысах данными, где через 7 дней после введения ЛПС в дозе 5 мг/кг также не было обнаружено отличий от контрольных животных по уровню тревожности в тесте ПКЛ [27].

Наиболее распространенным ответом на введение ЛПС является угнетение двигательной активности. Это угнетение, обнаруженное в ПКЛ через 24 ч после однократного введения ЛПС в дозах 0.5 и 5 мг/кг, согласуется с данными других исследователей, наблюдавших подобный эффект, например, в тесте открытого поля у мышей через сутки после введения ЛПС в дозе 0.83 мг/кг [28].

Механизмы индукции эндотоксином поведенческих ответов могут включать увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов. В сыворотке и префронтальной коре самцов мышей через сутки после однократного введения ЛПС (0.83 мг/кг) иммуноферментным методом было обнаружено увеличение уровней провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1бета, ИЛ-6 и ФНО-альфа [11]. Измененные уровни периферических цитокинов, в том числе и ИЛ-1бета [29, 12], как правило, быстро, в зависимости от дозы введенного эндотоксина, нормализуются. В нашей работе уровень ИЛ-1бета в плазме крови, повышенный через сутки после однократного введения ЛПС, не отличался от контроля через неделю как после однократной, так и после повторных инъекций в течение этого периода. В части последствий повторных введений следует отметить сходство наших результатов с некоторыми результатами предшествующих исследований. В этих исследованиях уровень ИЛ-1бета после окончания введения крысам ЛПС в дозах 1 или 2 мг/кг ежедневно в течение 7 дней не отличался от контроля [30]. В отличие от периферии в центральной нервной системе вызванные эндотоксином изменения могут сохраняться более длительное время, например, и через 26 дней после внутрижелудочкового введения [13], что объясняет повышенный интерес в связи с поведенческими эффектами преимущественно к центральным цитокинам. В разных работах повышению тревожного поведения через сутки сопутствовало увеличение уровня цитокина в базолатеральной миндалине [16] или экспрессии его гена в гиппокампе [15, 17] и префронтальной коре [15]. Увеличение уровня белка и мРНК ИЛ-1бета в гиппокампе обнаруживалось у мышей вместе с повышенной тревожностью и через 2 суток после введения [18]. Подавление экспрессии гена этого цитокина в гиппокампе мышей значительно ослабляло у животных тревожность, оцененную в тесте открытого поля через сутки после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг [14].

Вызываемое эндотоксином транзиторное увеличение периферических уровней ИЛ-1бета, по-видимому, не столь важно для изменения тревожности, как для двигательной активности, что подтверждается отсутствием выявленных в нашей работе достоверных корреляций со значениями ассоциированных с повышенной тревожностью поведенческих показателей. На наличие же взаимосвязи между угнетением двигательной активности и повышением уровня ИЛ-1бета указывает выявленная впервые достоверная отрицательная корреляция между значениями этих параметров через сутки после введения ЛПС.

Таким образом, полученные результаты указывают на участие индуцированного ЛПС повышения содержания ИЛ-1бета, прежде всего, в транзиторном угнетающем влиянии эндотоксина на двигательную активность.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (Г. Т. Ш., Н. Н. Д.), сбор данных (Г. Т. Ш., Н. П. К.), обработка данных (Г. Т. Ш., Н. П. К., А. И. М.), написание и редактирование манускрипта (Г. Т. Ш., Н. Н. Д., Н. П. К., А. И. М.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджетного проекта № FWNR-2022–0023. 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 биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН, протокол № 8 от 19.03.2012 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhong X, Qiang Y, Wang L, Zhang Y, Li J, Feng J, Cheng W, Tan L, Yu J (2023) Peripheral immunity and risk of incident brain disorders: a prospective cohort study of 161,968 participants. *Transl Psychiatry* 13(1): 382.
<https://doi.org/10.1038/s41398-023-02683-0>
2. Petralia MC, Mazzon E, Fagone P, Basile MS, Lenzo V, Quattropani MC, Di Nuovo S, Bendtzen K, Nicoletti F (2020) The cytokine network in the pathogenesis of major depressive disorder. Close to translation? *Autoimmun Rev* 19(5): 102504.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102504>
3. Réus GZ, Manosso LM, Quevedo J, Carvalho AF (2023) Major depressive disorder as a neuro-immune disorder: Origin, mechanisms, and therapeutic opportunities. *Neurosci Biobehav Rev* 155: 105425.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105425>
4. Chang J, Jiang T, Shan X, Zhang M, Li Y, Qi X, Bian Y, Zhao L (2024) Pro-inflammatory cytokines in stress-induced depression: Novel insights into mechanisms and promising therapeutic strategies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 131: 110931.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110931>
5. Syed SA, Beurel E, Loewenstein DA, Lowell JA, Craighead WE, Dunlop BW, Mayberg HS, Dhabhar F, Dietrich WD, Keane RW, de Rivero Vaccari JP, Nemeroff CB (2018) Defective Inflammatory Pathways in Never-Treated Depressed Patients Are Associated with Poor Treatment Response. *Neuron* 99(5): 914–924.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.001>
6. Tang Z, Ye G, Chen X, Pan M, Fu J, Fu T, Liu Q, Gao Z, Baldwin DS, Hou R (2018) Peripheral proinflammatory cytokines in Chinese patients with generalised anxiety disorder. *J Affect Disord* 225: 593–598.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.08.082>
7. Liu CH, Hua N, Yang HY (2021) Alterations in Peripheral C-Reactive Protein and Inflammatory Cytokine Levels in Patients with Panic Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuropsychiatr Dis Treat* 17: 3539–3558.
<https://doi.org/10.2147/ndt.s340388>
8. Yirmiya R (1996) Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res* 711(1–2): 163–174.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01415-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01415-2)
9. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9(1): 46–56.
<https://doi.org/10.1038/nrn2297>

10. *Swiergiel AH, Dunn AJ* (2007) Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. *Pharmacol Biochem Behav* 86(4): 651–659. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.02.010>
11. *Weng L, Dong S, Wang S, Yi L, Geng D* (2019) Macranthol attenuates lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors by inhibiting neuroinflammation in prefrontal cortex. *Physiol Behav* 204: 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.02.010>
12. *Brognara F, Castania JA, Kanashiro A, Dias DPM, Salgado HC* (2021) Physiological Sympathetic Activation Reduces Systemic Inflammation: Role of Baroreflex and Chemoreflex. *Front Immunol* 12: 637845. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.637845>
13. *Lee B, Shim I, Lee H, Hahm DH* (2018) Gypenosides attenuate lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and anxiety-like behaviors in rats. *Anim Cells Syst (Seoul)* 22(5): 305–316. <https://doi.org/10.1080/19768354.2018.1517825>
14. *Li M, Li C, Yu H, Cai X, Shen X, Sun X, Wang J, Zhang Y, Wang C* (2017) Lentivirus-mediated interleukin-1 β (IL-1 β) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice. *J Neuroinflammat* 14(1): 190. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0964-9>
15. *Alzarea S, Rahman S* (2019) Alpha-7 nicotinic receptor allosteric modulator PNU120596 prevents lipopolysaccharide-induced anxiety, cognitive deficit and depression-like behaviors in mice. *Behav Brain Res* 366: 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.019>
16. *Zheng ZH, Tu JL, Li XH, Hua Q, Liu WZ, Liu Y, Pan BX, Hu P, Zhang WH* (2021) Neuroinflammation induces anxiety- and depressive-like behavior by modulating neuronal plasticity in the basolateral amygdala. *Brain Behav Immun* 91: 505–518. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.007>
17. *Matsuura S, Nishimoto Y, Endo A, Shiraki H, Suzuki K, Segi-Nishida E* (2023) Hippocampal Inflammation and Gene Expression Changes in Peripheral Lipopolysaccharide Challenged Mice Showing Sickness and Anxiety-Like Behaviors. *Biol Pharm Bull* 46(9): 1176–1183. <https://doi.org/10.1248/bpb.b22-00729>
18. *Shentu Y, Chen M, Wang H, Du X, Zhang W, Xie G, Zhou S, Ding L, Zhu Y, Zhu M, Zhang N, Du C, Ma J, Chen R, Yang J, Fan X, Gong Y, Zhang H, Fan J* (2024) Hydrogen sulfide ameliorates lipopolysaccharide-induced anxiety-like behavior by inhibiting checkpoint kinase 1 activation in the hippocampus of mice. *Exp Neurol* 371: 114586. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2023.114586>
19. *Cruz AP, Frei F, Graeff FG* (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49(1): 171–176. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90472-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90472-3)
20. *Walf AA, Frye CA* (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2(2): 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
21. *Nava F, Carta G* (2001) Melatonin reduces anxiety induced by lipopolysaccharide in the rat. *Neurosci Lett* 307(1): 57–60. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01930-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01930-9)
22. *Bassi GS, Kanashiro A, Santin FM, de Souza GE, Nobre MJ, Coimbra NC* (2012) Lipopolysaccharide-induced sickness behaviour evaluated in different models of anxiety and innate fear in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110(4): 359–369. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00824.x>
23. *Gong X, Hu H, Qiao Y, Xu P, Yang M, Dang R, Han W, Guo Y, Chen D, Jiang P* (2019) The Involvement of Renin-Angiotensin System in Lipopolysaccharide-Induced Behavioral Changes, Neuroinflammation, and Disturbed Insulin Signaling. *Front Pharmacol* 10: 318. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00318>
24. *Shishkina GT, Bannova AV, Komysheva NP, Dygalo NN* (2020) Anxiogenic-like effect of chronic lipopolysaccharide is associated with increased expression of matrix metalloproteinase 9 in the rat amygdala. *Stress* 23(6): 708–714. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1793943>
25. *Moraes MM, Galvão MC, Cabral D, Coelho CP, Queiroz-Hazarbassanov N, Martins MF, Bondan EF, Bernardi MM, Kirsten TB* (2017) Propentofylline Prevents Sickness Behavior and Depressive-Like Behavior Induced by Lipopolysaccharide in Rats via Neuroinflammatory Pathway. *PLoS One* 12(1): e0169446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169446>

26. *Komyшева NP, Shishkina GT, Kalinina TS, Dygalo NN* (2021) Features of the Responses of the Protective Systems of the Brain in Adult Rats to Stressors and Lipopolysaccharide. *Neurosci Behav Physiol* 51: 367–371.
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01080-8>
27. *Bossù P, Cutuli D, Palladino I, Caporali P, Angelucci F, Laricchiuta D, Gelfo F, De Bartolo P, Caltagirone C, Petrosini L* (2012) A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF- α and IL-18. *J Neuroinflammation* 9: 101.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-101>
28. *Wang X, Zhu L, Hu J, Guo R, Ye S, Liu F, Wang D, Zhao Y, Hu A, Wang X, Guo K, Lin L* (2020) FGF21 Attenuated LPS-Induced Depressive-Like Behavior via Inhibiting the Inflammatory Pathway. *Front Pharmacol* 11: 154.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00154>
29. *Wang Q, Timberlake MA 2nd, Prall K, Dwivedi Y* (2017) The recent progress in animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 77: 99–109.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.008>
30. *Salari M, Esmailpour K, Mohammadipoor-Ghasemabad L, Taheri F, Hosseini M, Sheibani V* (2024) Impact of Sleep Deprivation on the Brain's Inflammatory Response Triggered by Lipopolysaccharide and Its Consequences on Spatial Learning and Memory and Long-Term Potentiation in Male Rats. *Neuroimmunomodulation* 31(1): 12–24.
<https://doi.org/10.1159/000535784>

Analysis of Correlations Between Behavioral Parameters in the Elevated Plus Maze and the Levels of Interleukin-1beta in Blood Plasma in Rats

N. P. Komyшева^{a,*}, G. T. Shishkina^a, A. I. Mukhamadeeva^a, and N. N. Dygalo^a

^a*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

**e-mail: agarina@bionet.nsc.ru*

Peripheral cytokines may influence psychoemotional behavior, but the role of interleukin-1beta (IL-1beta) in altering anxiety and motor activity in response to inflammatory activation remains unclear. To clarify this issue, correlations between behavioral parameters in the elevated plus maze (EPM) test and plasma levels of IL-1beta after administration of the proinflammatory stimulus lipopolysaccharide (LPS) in different modes were analyzed in adult male rats. LPS in doses of 0.5 or 5 mg/kg, as well as physiological solution (control), were administered to rats intraperitoneally. The most pronounced behavioral effect 24 hours after a single injection was an endotoxin dose-dependent inhibition of the animals' motor activity. After a dose of 5 mg/kg, increased anxious behavior was also noted every other day. The behavioral changes caused by the high dose of endotoxin were completely normalized after a week. The behavior of the animals one day after the end of repeated injections of LPS at a lower dose for a week (0.5 mg/kg; once every two days) also did not differ from the control. The inhibition of motor activity after LPS could be due to an increase in the level of IL-1beta in the blood plasma, as indicated by the identified significant negative correlations between IL-1beta and the corresponding behavioral parameters. No significant correlation was found between the peripheral level of IL-1beta and such a classic indicator of anxiety as the percentage of entries into the open arms of the maze. In general, the obtained results allow us to conclude that IL-1beta is an undoubted participant in the mechanism of the transient inhibitory effect of LPS on motor activity.

Keywords: lipopolysaccharide, proinflammatory cytokines, interleukin-1beta, inflammation, anxiety, motor activity

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ФОРМИРОВАНИЕ УСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА АКТИВНОГО ИЗБЕГАНИЯ
У КРЫС С РАЗНЫМ УРОВНЕМ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ
К АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ**

© 2024 Н. М. Сурина^{1,*}, С. Н. Кондратова¹, Г. М. Николаев¹, И. Б. Федотова¹,
И. И. Полетаева¹

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

*E-mail: Opera_ghost@inbox.ru

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 22.06.2024 г.

Принята к публикации 24.06.2024 г.

Трудности в обучении – достаточно частое сопутствующее осложнение пациентов с диагнозом «эпилепсия». Взаимосвязь предрасположенности к эпилепсии и способности к обучению представляется важной проблемой. В работе стояла задача проанализировать, как различается способность к обучению у крыс с различной предрасположенностью к рефлекторной аудиогенной эпилепсии (АЭ). Оценивали успешность формирования навыка условно-рефлекторной реакции активного избегания (УРАИ) в челночной камере у крыс 3 линий. Это были крысы, предрасположенные к аудиогенной эпилепсии – линия Крушинского-Молодкиной (КМ), линия «4» (селектированная из популяции F2 гибридов линии КМ и нечувствительных к звуку Вистар) и крысы линии «0», селектированные на отсутствие аудиогенной эпилепсии из той же популяции (т.е. эти линии, диаметрально отличаются по предрасположенности к аудиогенной эпилепсии, но имеют сходный генетический фон). Обучение проводилось непрерывно в течение 5 дней (20 предъявлений в день). Эксперименты показали достоверно более успешное усвоение данного навыка у крыс линии «0»: суммарно за 5 дней обучения УРАИ критерия обученности (70% УРАИ в день) достигли 75% животных. Показатели линии «4» были промежуточными – 41.7%, и только 1 из 12 крыс линии КМ (8.3%) обучилась по данному протоколу. Таким образом, удалось выявить более успешное обучение у крыс, селектированных на отсутствие судорог в ответ на сильный звук (линия «0») по сравнению с крысами линий КМ и «4» (демонстрирующих тонические судороги максимальной интенсивности в ответ на звуковую стимуляцию). Наиболее слабое усвоение навыка выявлено у линии КМ, селекция которой на предрасположенность к аудиогенной эпилепсии была значительно более длительной, чем у крыс линии «4».

Ключевые слова: аудиогенная эпилепсия, линия Крушинского–Молодкиной, линия «0», линия «4», крысы, условный рефлекс активного избегания, межсигнальные реакции

DOI: 10.31857/S0869813924070071, **EDN:** BDQFQH

Принятые сокращения: АЭ – аудиогенная эпилепсия; КМ – крысы линии Крушинского-Молодкиной; УРАИ – условная реакция активного избегания; УС – условный стимул; БС – безусловный стимул; ЛП – латентный период; МСР – межсигнальные реакции.

ВВЕДЕНИЕ

Аудиогенная эпилепсия (АЭ) грызунов – феномен, описанный впервые более 100 лет назад, по-прежнему требует внимания нейрофизиологов, поскольку линии животных с высокой предрасположенностью к АЭ – ценная модель для исследования эпилептогенеза [1]. Аномальную реакцию грызунов на сильный звук можно предположительно рассматривать как аномально усиленную видоспецифическую реакцию избегания [2]. Следует отметить, что несмотря на большое число исследований механизмов АЭ и реакций предрасположенных к АЭ животных на фармакологические агенты, четких данных о способности таких животных к обучению условно-рефлекторной реакции избегания (УРАИ) удара электрического тока мало [3], хотя роль эпилептогенеза на обучаемость другим навыкам оценивается достаточно успешно, например, [4, 5]). Во многих исследованиях оценивают не особенности обучения предрасположенных к судорогам животных, а влияние собственно состояния после судорожных припадков на обучаемость, например [6, 7]), при этом следует учитывать, что точный момент окончания судорожного припадка не всегда возможно определить.

Следует также отметить, что если в популяциях человека нарушения способности к обучению встречаются в 2–10% случаев, то у больных эпилепсией эта доля достигает 25% [8, 9], что и определяет значимость подобных исследований.

Таким образом, особый интерес представляет анализ способности к обучению у крыс нескольких генетических групп с различной предрасположенностью к АЭ. Крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ) – старейшая в мире линия крыс, селектированная на АЭ, с максимальной экспрессивностью и пенетрантностью признака среди аналогичных линий. К линии КМ есть «собственный контроль» со сходным генетическим фоном – это линии «0» и «4». Эти линии были селектированы на отсутствие АЭ и на высокую предрасположенность к АЭ на основе популяции F2-гибридов от скрещивания крыс линии КМ с крысами аутбредной популяции Вистар (специально отобранными на отсутствие проявлений АЭ) [10]. Селекцию крыс этих новых линий начали около 15 лет назад, они имеют сходный генетический фон друг с другом и частично с линией КМ [11]. Отметим также, что линия КМ разводится независимо от исходной популяции Вистар, начиная с конца 1940 г., то есть более 70 лет. При селекции крыс на отсутствие АЭ наибольшую «сложность» представляет выведение линии «0», поскольку полное отсутствие эпилептиформной реакции в ответ на действие звука обнаруживается в каждом поколении не более чем у 50% животных.

Задачей настоящего исследования было оценить показатели усвоения навыка УРАИ у крыс трех генотипов с различной предрасположенностью к АЭ – инбредной линии КМ, а также у крыс линий «0» и «4».

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В обеих сериях экспериментов, описанных в настоящей работе, были использованы крысы-самцы трех линий – КМ ($n = 12$), «4» ($n = 12$), и «0» ($n = 12$) в возрасте 6 месяцев. Животные содержались в клетках по 6 особей; с кормом (фирма Лаборатормкорм) и водой *ad lib*, без предварительной процедуры хендлинга. Предрасположенность к АЭ оценивали в условных баллах по принятому стандарту [12] в 3-месячном возрасте. У крыс линий КМ и «4» чувствительность к звуку была максимальной (балл «4», тонические судороги всего тела и конечностей), в то время как у всех крыс линии «0», использованных в эксперименте, АЭ судорог не было [10].

Эксперименты по обучению УРАИ проводили у 6-месячных животных. В 1-й серии было использовано 12 крыс линии КМ, 10 крыс линии «4» и 12 крыс линии «0» ($n = 12$), во второй – по 12 животных каждой из линий.

Схема опыта: обучение УРАИ проводили в экспериментальной камере (60 x 30 x 30 см) с двумя отделениями и электрифицированным полом. Условным стимулом (УС) было включение света (400 люкс, 1-я серия опытов) или звука (80 дБ, который не вызывал судорог АЭ у крыс линий КМ и «4», 2-я серия опытов). Следует отметить, что судороги у крыс линий КМ и «4» провоцируются при громкости звука в 120 дБ. Безусловным стимулом (БС) была подача электрического тока на решетчатый пол одной из половин экспериментальной камеры (сила тока около 0.6 мА).

Процедура формирования УРАИ: через 20–30 с после помещения животного в камеру включали УС (изолированное действие 10 с), после чего включали БС (совместное с УС действие длилось 10 с). Переход крысы в безопасное отделение камеры выключало оба стимула. УРАИ считали выполненной, если животное переходило в безопасное отделение до включения БС. Каждому животному давали 20 предъявлений в день с оценкой доли (в %) выполненных УРАИ и межсигнальных реакций (т.е. переходов в другой отсек в отсутствие стимулов). В первой серии обучение проводили 7 дней, во второй – 5 дней. Вручную фиксировали латентный период (ЛП) перехода крысы в безопасный отсек на УС и/или БС. Длительность межстимульного интервала составляла около 30 с. Эксперименты проводились ежедневно. Регистрировали также проявление не только УРАИ, но и «реакции избавления», когда животное переходило в безопасный отсек только в ответ на включение тока (в таких случаях их ЛП оказывалось больше 10 с).

Статистическая обработка данных. Использовалась программа GraphPad Prism 8. 01 с применением двухфакторного ANOVA (факторы «день обучения» и «линия») с *post hoc* LSD анализом по Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1-я серия опытов. Поскольку результаты по успешности обучения УРАИ крыс трех линий в целом совпадают (с более успешным обучением крыс линии «0»), подробные данные по серии 1 не приводятся. Следует, однако, отметить важные различия в реакциях крыс, выявленные в двух сериях. В серии 1 крысы обеих линий за 7 дней обучения (УС – включение света) не достигли критерия обученности (75% УРАИ в опытный день), но было отмечено, что крысы линии «0» обучались более успешно. В то же время в этой серии опытов был выявлен принципиально важный феномен – у пяти крыс линии КМ и одной крысы линии «4» во время межстимульного интервала наблюдались клонические и/или тонические судорожные припадки по «аудиогенному» типу. Такие припадки происходили преимущественно в первые дни обучения (с 1-го по 3-й), но у одной крысы линии КМ они продолжались регулярно до 6-го дня обучения (при ежедневных экспериментах). Отметим, что этот феномен, выявленный только у чувствительных к звуку крыс, наблюдался впервые.

2-я серия опытов. В данной серии УС служило включение звука. В каждый из пяти дней обучения ЛП перехода в противоположный отсек камеры был наибольшим у крыс линии КМ, а наименьшим – у крыс линии «0» (рис. 1). Если ЛП оказывался больше 10 с, то это означало, что переход был совершен в ответ на включение тока (БС), если ЛП был короче 10 с, то это была реакция на УС (звук).

Двухфакторный ANOVA показателей ЛП перехода в безопасный отсек выявил достоверное влияние фактора «линия» ($F_{2,165} = 88.26, p < 0.001$) и фактора «день обучения» ($F_{4,165} = 34.91, p < 0.001$). Различия в ЛП между показателями ЛП крыс линий КМ и «4» были недостоверными только в 3-й и 4-й дни обучения, тогда как в остальные дни у крыс линии «4» ЛП был достоверно короче, чем у КМ, что свидетельствует об их более эффективном усвоении навыка по сравнению с КМ. У крыс линии «0» во все дни обучения ЛП был высоко достоверно короче, чем у КМ и «4».

Основные показатели, отражающие обучаемость условной реакции активного избегания – это сокращение числа реакций избавления (переходов в ответ на БС) и возраста-

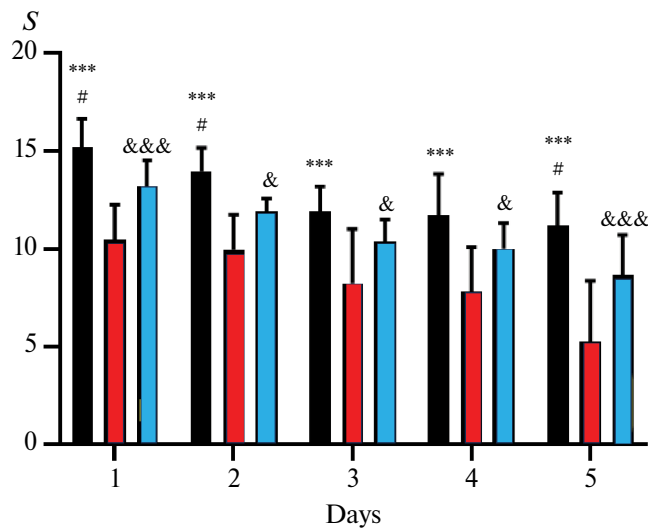


Рис. 1. Средние величины латентного периода. Ордината – S , среднее $\pm$ ошибка среднего перехода животного в безопасный отсек челночной камеры у крыс 3-й линии; абсцисса – дни опытов. Черные столбики – крысы линии КМ, красные – линии «0», синие – линии «4». *** – достоверные отличия от показателей линии «0», $p < 0.001$; # – достоверные отличия от показателей линии «4», $p < 0.05$, & &&& – достоверные отличия от показателей линии «0», $p < 0.05$ и 0.001 соответственно (двухфакторный ANOVA, *post hoc* LSD по Тьюки).

ние числа реакций избегания (переходов в ответ на УС); а также укорочение латентного периода этой реакции. Для оценки процесса обучения (перехода животного в безопасный отсек в ответ на УС) следует также проанализировать динамику проявлений межсигнальных реакций (МСР), т.е. переходов в другой отсек камеры без получения УС и /или БС (т.е. в интервалах времени, когда ни УС, ни БС не подавали) (рис. 2). Экспрессия МСР отражает формирование у животного условно-рефлекторной реакции на «контекст», т.е. на обстановку теста. В данном исследовании долю МСР в ходе формирования УРАИ определяли как отношение числа проб, после которых были отмечены МСР, к общему числу проб в данный день (число проб – 20). Двухфакторный ANOVA данных по доле МСР выявил достоверное влияние фактора «линия», $F_{2,165} = 32.62$, $p < 0.001$, и фактора «день обучения», $F_{4,165} = 58.34$, $p < 0.001$. В 1- и 2-й дни обучения статистически значимые межлинейные различия по доле МСР между тремя группами крыс отсутствовали, т.е. выполнение реакции «на контекст» было сходным. В 3- и 4-й дни у крыс КМ доля МСР была достоверно выше, чем у «0» (причем на 4-й день эта доля значимо отличалась и от показателя линии «4»). На 5-й день обучения у крыс «0» доля МСР была достоверно меньше, чем у КМ и «4», а наибольшая величина этого показателя была у КМ. ANOVA выявил различия и по фактору «линия» ($F_{2,165} = 32.62$, $p < 0.001$), и по фактору «день обучения» ($F_{4,165} = 58.34$, $p < 0.001$). В первый день обучения доли МСР (проявления при 20 сочетаний УС – БС) у 3 линий не различались, а доли МСР у КМ vs «0» были достоверно разными, начиная с 3-го дня обучения (3-й день – $p < 0.05$, 4- и 5-й дни – $p < 0.0001$). Интересно отметить, что по этому показателю крысы линии «4» в 3–5-е дни обучения занимали «промежуточное положение» (рис. 2). У них было достоверно меньше МСР, чем у КМ (4-й и 5-й дни $p < 0.001$) и немного больше, чем у крыс линии «0» (5-й день – $p < 0.05$). МСР, т.е. условно-рефлекторные реакции на контекст были более четко выражены у крыс линии КМ, а их угашение (как проявление ассоциативных способностей) протекало у них медленнее, чем у крыс «4» и «0».

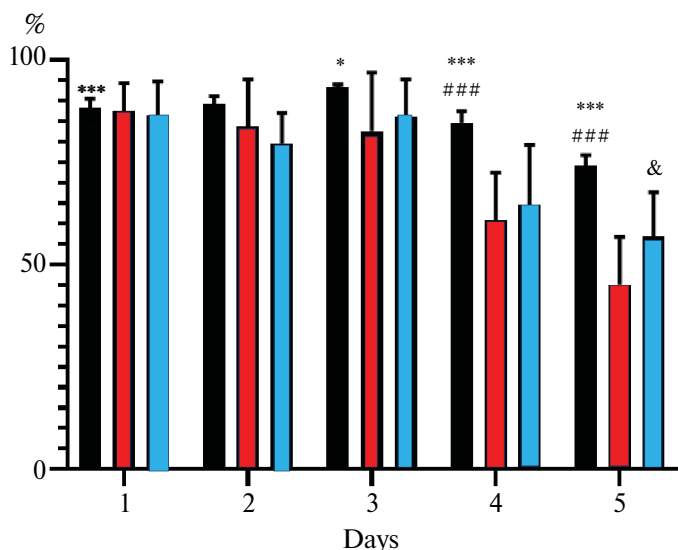


Рис. 2. Доли межсигнальных реакций при ежедневных сочетаниях условного и безусловного стимулов у крыс 3 линий. Обозначения, как на рис. 1. Черные столбики – крысы линии КМ, красные – линии «0», синие – линии «4». *, *** – достоверные отличия от линии «0», $p < 0.05$ и 0.001 соответственно; ### – достоверное отличие от линии «4», $p < 0.001$; & – достоверное отличие от линии «0», $p < 0.05$ (двухфакторный ANOVA с *post hoc* LSD по Тьюки).

Двухфакторный ANOVA (с *post hoc* LSD по Тьюки) для долей МСР выявил различия и по фактору «линия» ($F_{2,165} = 32.62$, $p < 0.001$), и по фактору «день обучения» ($F_{4,165} = 58.34$, $p < 0.001$). В 1- и 2-й дни обучения статистически значимые межлинейные различия по доле МСР между тремя группами крыс отсутствовали. В 3–5-е дни у крыс КМ доля МСР была достоверно выше, чем у «0». На 5-й день обучения у крыс «0» доля МСР была достоверно меньше, чем у «4», а наибольшая величина этого показателя была у КМ.

Реакция избегания – это переход животного в другую часть камеры в ответ на звуковой сигнал. Кривые обучения (рис. 3) построены по долям этих реакций в каждый из дней обучения. Наибольшая доля (%) успешных реакций избегания во все дни обучения была у крыс линии «0», у крыс КМ увеличения этого показателя к пятому дню не произошло.

Двухфакторный ANOVA выявил достоверное влияние на данный признак фактора «линия» ($F_{2,165} = 48.29$, $p < 0.001$) и фактора «день обучения» ($F_{4,165} = 39.10$, $p < 0.001$). Рис. 3 показывает, что на 5-й день доля УРАИ была достоверно наименьшей у крыс КМ и наибольшей – у «0».

Суммарно за 5 дней обучения УРАИ критерия обученности (70% УРАИ в день) достигли 9 из 12 крыс линии «0» (т.е. 75% животных), 5 из 12 крыс линии «4» (41.7%), и 1 из 12 крыс линии КМ (8.3%). Иными словами, крысы линии «0» обучались более успешно, чем крысы двух других линий. По тесту ϕ Фишера (оценка разности альтернативных долей) в линии «0» было достоверно больше особей, достигших критерия обученности, чем в линии КМ ($p < 0.001$) и чем в линии «4» (тенденция). У крыс КМ показатели обученности были самыми низкими (по этому показателю они достоверно отличались и от линии «4», $p < 0.05$).

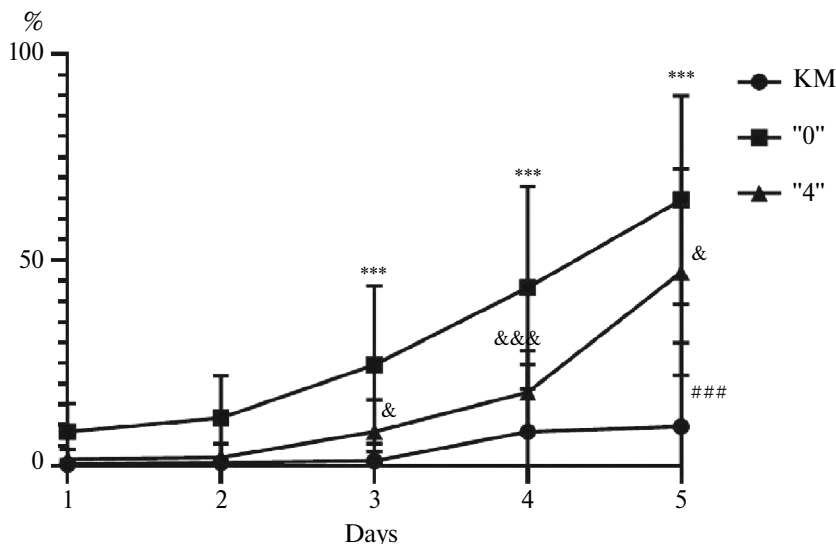


Рис. 3. Кривые обучения УРАИ крыс 3 линий. Ордината – доли УРАИ от 20 предъявлений сочетания УС-БС, (%), по оси абсцисс- дни опытов. *** – достоверность отличия от показателей линии KM, $p < 0.001$, # – достоверность отличия показателей линии KM от линии «4» & & & – достоверность отличия показателей линии «4» от таковых линии «0» (двухфакторный ANOVA, *post hoc* LSD тест по Тьюки).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, несмотря на различия в динамике формирования УРАИ, данные двух серий экспериментов дали в целом сходные результаты – обучение УРАИ у крыс линии «0» было более результативным, чем у крыс KM и «4», что можно считать четко установленным фактом. То обстоятельство, что в 1-й серии опытов у крыс KM в межсигнальных интервалах обнаруживались судорожные припадки, тогда как во 2-й серии этот феномен отсутствовал, можно отнести за счет эпигенетических эффектов, связанных с высокой инбредностью крыс KM [13]. Мы не можем не учитывать также, что использование в 1-й серии опытов включения света в качестве УС могло иметь провоцирующее влияние на развитие судорог по типу АЭ (новый тип стимуляции, вызвавшей активацию поведения).

Следует также отметить, что несмотря на высокую интенсивность припадков АЭ у крыс линии «4» (тестированных за 3 месяца до настоящих экспериментов), не отличающуюся от таковой линии KM, их обучаемость УРАИ была несколько выше, чем у KM. Это можно объяснить тем, что у линий «0» и «4» общий генетический фон был более сходным, чем генетический фон KM. Иными словами, эти данные лишний раз подчеркивают важность учета полигенного определения АЭ у крыс и феномена влияния генетической предрасположенности к АЭ на формирование условно-рефлекторной защитной реакции у крыс заслуживает дальнейшего анализа.

Динамика ЛПП перехода в безопасный отсек по дням обучения также свидетельствует о более быстрой реакции крыс линии «0» даже в первый день обучения, когда у многих животных преобладали реакции избавления (т.е. реакции на подачу тока, а не на УС). Эти данные позволяют говорить о более успешной адаптации крыс «0» к условиям среды по сравнению с KM и «4» – т.е. о торможении у них реакции на «контекст» и развитием реакции на УС. В литературе по обучению крыс конкретно условно-рефлекторным реакциям на удар тока этот аспект обучаемости анализируется мало, поскольку основное

внимание авторы уделяют динамике торможения контекстуальных реакций с использованием преимущественно односторонней реакции избегания и оценкой роли структур переднего мозга в экспрессии этих признаков [14]. Следует упомянуть, что ранее были проведены сходные эксперименты по сравнению обучаемости УРАИ у крыс КМ и крыс линии «0», но первичные данные по ним утеряны. Однако более успешная обучаемость крыс линии «0» была обнаружена и в том исследовании.

Проблему предрасположенности к АЭ следует рассматривать отдельно от влияния собственно судорог на обучаемость, поскольку генетическая предрасположенность к АЭ связана с особенностями генома и транскриптома животных соответствующих генотипов [15–17].

Формирование УРАИ у крыс бразильской линии Wistar Audiogenic Rat (WAR) [18] также показало, что они обучались значительно менее успешно, чем контрольная исходная популяция Вистар. Это сопоставимо с данными, полученными в представленном исследовании. У крыс GEPR (предрасположенных к АЭ, выведенных из популяции Sprague-Dowley) было продемонстрировано менее успешное обучение (но не УРАИ, как таковой) [19]. Можно предположить, что у крыс с предрасположенностью к АЭ особенности формирования стресс-реакции на серийное болевое раздражение влияют и на ассоциативные процессы. Но, как показано в представленной работе, у крыс КМ и «4» реакции на контекст (т.е. межсигнальные реакции) формируются достаточно успешно. Возможно, что существенную роль в различиях по формированию УРАИ играют особенности развития стресс-реакции. Уровень кортикостерона в плазме крови у крыс линии «0» в фоне (т.е. без действия звука) был значимо выше, чем у крыс КМ [20]. Возможно, что особенности стрессорной реакции линии «0», сформировавшиеся в ходе отбора на отсутствие АЭ, и были тем фактором, который обусловил преимущество крыс «0» в выработке УРАИ. Следует также отметить, что действие звука, не вызывающее судорог у крыс «0» и Вистар, не сопровождается подъёмом уровня кортикостерона, в то время как у крыс линии КМ через 30 мин после судорог такой подъем происходит [20]. Можно предположить, что действие звука *per se* не вызывает стресс-реакции. Однако в целом связь обучаемости УРАИ и АЭ остается важной проблемой для патофизиологии. Ранее мы привели ряд доказательств того, что феномен АЭ может быть следствием наличия у грызунов врожденной интенсивной реакции избегания сильных звуков [2], что также следует рассматривать при оценке обнаруженных особенностей обучению УРАИ в настоящем исследовании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эксперименты с крысами трех линий по выработке реакции активного избегания удара электрического тока в челночной камере позволили выявить более успешное обучение у крыс линии «0» (селектированной на отсутствие судорог в ответ на сильный звук) по сравнению с крысами линий КМ и «4», у которых действие интенсивной звуковой стимуляции вызывает тонические судороги максимальной интенсивности.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н. М. С., И. Б. Ф., И. И. П.), сбор данных (С. Н. К., Н. М. С., Г. М. Н.), обработка данных (С. Н. К., Н. М. С., И. И. П.), написание и редактирование манускрипта (И. И. П., Н. М. С.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова № 121032500080–8. 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 биоэтике Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, протокол № 12 от 12.03.2014 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ross KS, Coleman JR (2000) Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 639–653.
2. Fedotova IB, Surina NM, Nikolaev GM, Revishchin AV, Poletaeva II (2021) Rodent Brain Pathology, Audiogenic Epilepsy. *Biomedicines* 9(11): 1–14.
3. Castro GP, Medeiros DC, Guarnieri LO, Mourão FG, Pinto HPP, Pereira GS, Moraes MFD (2017) Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. *Epilepsy Behav* 71: 243–249.
4. Плещачева МГ, Зорина ЗА, Николенко ДЛ, Вольфер ДП, Костына ЗА, Липп ХП (2002) Поведение в водном тесте Морриса крыс линии Крушинского – Молодкиной, селективированных на повышенную судорожную готовность. *Журн высш нерв деят* 52(3): 356–365. [Pleskacheva MG, Zorina ZA, Nikolenko DL, Wolfer DP, Kostyna ZA, Lipp HP (2002) Behavioral impairments in Morris water maze in rats selectively bred for audiogenic seizure susceptibility (Krushinsky-Molodkina strain). *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova* 52(3): 356–365. (In Russ)].
5. Smolensky IV, Zubareva OE, Kalemenev SV, Lavrentyeva VV, Dyomina AV, Karepanov AA, Zaitsev AV (2019) Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Behav Brain Res* 372: 112044. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112044>
6. van der Staay J, Teun Schuurman T, van Reenen CG, Korte SM (2009) Emotional reactivity and cognitive performance in aversively motivated tasks: a comparison between four rat strains. *Behav Brain Funct* 5: 50.
7. Garcia-Cairasco N, Umeoka EHL, Cortes de Oliveira JA (2017) The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy Behav* 71: 250–273.
8. Beghi M, Cornaggia CM, Frigeni B, Beghi E (2006) Learning disorders in epilepsy. *Epilepsia* 47: 14–18.
9. Subramaniam SR, Khoo CS, Raymond AA, Che Din N, Syed Zakaria SZ, Tan HJ (2020) Prevalence and factors of verbal learning and memory dysfunction in patients with epilepsy – A single centre study. *J Clin Neurosci* 73: 31–36.
10. Федотова ИБ, Костына ЗА, Сурина НМ, Полетаева ИИ (2012) Селекция лабораторных крыс по признаку «отсутствие предрасположенности к аудиогенному судорожному припадку». *Генетика* 48(6): 685–691. [Fedotova IB, Kostyna ZA, Surina NM, Poletaeva II. (2012) Laboratory rat selection for the trait "the absence of audiogenic seizure proneness". *Genetika* 48(6): 685–691. (In Russ)].
11. Poletaeva II, Surina NM, Kostina ZA, Perepelkina OV, Fedotova IB (2017) The Krushinsky-Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. *Epil. Behav* (71, Part B): 130–141.
12. Семиохина АФ, Федотова ИБ, Полетаева ИИ (2006) Крысы линии Крушинского–Молодкиной: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения. *Журн высш нерв деят* 56(2): 249–267. [Semiokhina AF, Fedotova IB, Poletaeva II (2006) Rats of Krushinsky-Molodkina strain: studies of audiogenic epilepsy, vascular pathology, and behavior. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 56(3): 298–316.]
13. Иванов ПА, Семиохина АФ, Рысков АП (1989) Геномная дактилоскопия крыс *Rattus norvegicus*. Новый подход к генетическому маркированию. *Генетика* 25(2): 238–249. [Ivanov PL, Semiokhina AF, Ryskov AP (1989) DNA fingerprinting of *Rattus norvegicus*: a new approach in genetic analysis. *Genetika* 25(2): 238–249.]
14. Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC (2016) Fear Memory. *Physiol Rev* 96(2): 695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>

15. *Damasceno S, Gómez-Nieto R, García-Cairasco N, Herrero-Turrión MJ, Marín F and López DE* (2020) Top Common Differentially Expressed Genes in the Epileptogenic Nucleus of Two Strains of Rodents Susceptible to Audiogenic Seizures: WAR and GASH/Sal. *Front Neurol* 11:33. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00033>
16. *Chuvakova LN, Funikov SY, Rezvykh AP, Davletshin AI, Evgen'ev MB, Litvinova SA, Fedotova IB, Poletaeva II, Garbuz DG* (2021) Transcriptome of the Krushinsky-Molodkina audiogenic rat strain and identification of possible audiogenic epilepsy-associated genes. *Front Mol Neurosci* 14:738930. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.738930>
17. *García-Peral C, Ledesma MM, Herrero-Turrión MJ, Gómez-Nieto R, Castellano O, López DE* (2023) Proteomic and bioinformatic tools to identify potential hub proteins in the audiogenic seizure-prone hamster GASH/Sal. *Diagnostics* 13: 1048. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13061048>
18. *Castro GP, Medeiros DC, Guarnieri LO, Mourão FAG, Pinto HPP, Pereira GS, Moraes MFD* (2017) Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. *Epilepsy Behav* 71(Pt B): 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.08.039>
19. *Holmes GL, Thompson JL, Marchi TA, Gabriel PS, Hogan MA, Carl FG, Feldman DS* (1990) Effects of seizures on learning, memory, and behavior in the genetically epilepsy-prone rat. *Ann Neurol* 27(1): 24–32. <https://doi.org/10.1002/ana.410270106>
20. *Fedotova IB, Nikolaev GM, Perepelkina OV, Belosludtseva NV, Mironova GD, Poletaeva II* (2018) Study of Uridine Effect on the Development of Audiogenic Tonic Seizures in Krushinsky-Molodkina Strain Rats. *Dokl Biol Sci* 481(1): 125–127. <https://doi.org/10.1134/S0012496618040014>

Active Avoidance Learning in Rats with Different Audiogenic Epilepsy Proneness

N. M. Surina^{a,*}, S. N. Kondratova^a, G. M. Nikolaev^a, I. B. Fedotova^a, and I. I. Poletaeva^a

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

^{*}*e-mail: Opera_ghost@inbox.ru*

The success of the formation of the conditioned reflex reaction of two-way avoidance in the shuttle chamber in rats of 3 strains was evaluated. These were rats predisposed to audiogenic epilepsy – the Krushinsky-Molodkina strain rats (KM), "4" strain (selected from a population of F2 hybrids of the KM strain and sound-insensitive Wistars) and rats of "0" strain, selected for the absence of audiogenic epilepsy from the same population (i.e. these strains, diametrically different in audiogenic epilepsy proneness, possessing a similar genetic background). Experiments have shown significantly more successful assimilation of this skill in rats of the "0" strain.

Keywords: audiogenic epilepsy, Krushinsky-Molodkina strain rats, "0" strain, "4" strain, rats, active avoidance learning, inter-signal reactions

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**О СВЯЗИ ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ
И СКОРОСТИ КРОВОТОКА В СОСУДАХ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО
РУСЛА КОЖИ У КРЫС**

© 2024 г. Н. Н. Петрищев¹, М. А. Скедина², Т. Г. Гришачева^{1,*}, С. Г. Чефу¹,
А. А. Ковалева², А. М. Носовский²

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика
И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

* E-mail: laser82@mail.ru

Поступила в редакцию 28.05.2024 г.

После доработки 08.07.2024 г.

Принята к публикации 10.07.2024 г.

Неинвазивное исследование реологических свойств крови является актуальной, но достаточно сложной задачей. При отклонениях значений системной вязкости крови и гематокрита изменяются показатели кровотока в разных звеньях микроциркуляторного русла (МЦР). Цель – изучение характеристик кровотока в МЦР кожи крыс, получаемых методом высокочастотной ультразвуковой доплерографии (ВУЗД) при заданных изменениях реологических параметров крови. Исследования проводили на половозрелых самцах крыс сток Wistar. Сформированы 3 экспериментальные группы. Группа 1 ($n = 21$) «Гемодилюция» – вязкость (η) 1.99 ± 0.02 мПа*с, гематокрит (Ht) $31.48 \pm 0.31\%$. Группа 2 ($n = 32$) «Норма» – животные с неизменными значениями крови – η 2.84 ± 0.03 мПа*с, Ht $41.60 \pm 0.3\%$. Группа 3 ($n = 32$) «Эритроцитоз» – η 3.95 ± 0.04 мПа*с, Ht $54.56 \pm 0.23\%$. Исследование динамической вязкости крови *in vitro* проводились на вибрационном вискозиметре. Для оценки гематокрита гепаринизированную цельную кровь центрифугировали в стеклянных капиллярах при помощи центрифуги. Измерение кровотока в МЦР кожи крыс в области левого бедра проводили методом ВУЗД с помощью аппаратно-программного комплекса «Минимакс-Допплер-К», ультразвуковым датчиком с частотой 20 МГц. Статистический анализ показал корректность выполнения моделей. Показатели крови животных трех групп статистически достоверно различались по значениям η крови и Ht. Для определения зависимостей между реологическими показателями крови и характеристиками скорости кровотока в МЦР был применен дискриминантный анализ. К наиболее значимым характеристикам кровотока, которые варьируются в зависимости от измененного состава крови, относятся: средняя систолическая скорость V_{as} ($p < 0.01$), средняя скорость V_{am} ($p < 0.001$), средняя объемная скорость Q_{am} ($p < 0.001$), индекс сопротивления сосудов RI ($p < 0.01$) и процентное содержание клеток крови, движущихся в диапазоне низкой скорости H' ($p = 0.03$). Проверка достоверности выбранных характеристик с использованием однофакторного дисперсионного анализа подтвердила их значимость в определении принадлежности к 3 исследуемым группам по данным ВУЗД. На основе данного анализа сформированы классификационные функции для неинвазивного определения динамической вязкости крови по данным ВУЗ доплерографии.

Ключевые слова: кровь, гемореология, вязкость крови, гематокрит, микроциркуляция, ультразвуковое исследование

ВВЕДЕНИЕ

Реологические свойства крови, ее форменных элементов, оказывают существенное влияние на эффективность кровотока в микроциркуляторном русле (МЦР) [1]. В наибольшей степени это проявляется в капиллярах, диаметр которых соизмерим с диаметром форменных элементов крови. Неинвазивное исследование реологических свойств крови является актуальной, но достаточно сложной задачей. Для ее решения, в настоящее время, применяют, главным образом, светоптические [2–4] либо кондуктометрические [5] методы.

Одним из неинвазивных методов исследования МЦР является также высокочастотная ультразвуковая доплерография (ВУЗД). Метод основан на эффекте Доплера – то есть сдвиге частоты сигнала после отражения от движущегося объекта, что позволяет получить характеристики кровотока в абсолютных значениях. При исследовании МЦР такими движущимися объектами являются форменные элементы крови.

Ранее авторами была проведена оценка возможности определения реологических свойств крови с помощью ВУЗД на физической модели «Имитаторе МЦР». В ходе исследования показано, что с помощью данного метода возможно определять влияние макрореологических свойств крови на скорость кровотока в системе микроциркуляции [6].

Можно предположить, что при заданных изменениях вязкости крови и гематокрита будут изменяться как характеристики кровотока в разных звеньях МЦР, так и распределение форменных элементов по скорости движения, указывая на связь с реологическими свойствами. Для проверки этой гипотезы были изучены характеристики кровотока, получаемые методом ВУЗД при заданных изменениях параметров крови, влияющих на ее реологические свойства.

Целью данной работы являлось изучение характеристик кровотока в МЦР кожи крыс, получаемых методом ВУЗД при заданных изменениях реологических параметров крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Исследования проводили на самцах крыс сток Wistar массой 350–400 г (Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова (НИЦ Курчатовский институт – ПИЯФ), Питомник лабораторных животных «Рапполово»).

Животные содержались при неограниченном потреблении стандартного корма К-120 («Информ-корм», Россия) и воды при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч (свет: темнота). Температура поддерживалась в пределах 22–25 °С, относительная влажность – 50–70%. Длительность карантина составляла 14 дней.

Все манипуляции, связанные с фиксацией животных, и инвазивными воздействиями проводились под наркозом. Животных наркотизировали свежеприготовленной смесью препаратов:

- золетил 100 («VIRBAC», Франция) – 1 мл;
- ксилазин гидрохлорид 2% («De Adelaar» B.V., Нидерланды) – 1 мл;
- 0.9%-ный стерильный раствор хлорида натрия – 1 мл.

Препараты вводили внутримышечно, в заднюю поверхность бедра, в дозе 0.8 мл/кг. Забор крови для исследования проводили из яремной, бедренной и задней полых вен. В качестве стабилизатора использовали гепарин 50 МЕ/мл (9:1).

После окончания эксперимента, (не выводя из наркоза) крыс подвергали эвтаназии.

Экспериментальные модели

Были сформированы 3 экспериментальные группы.

Группа 1 ($n = 21$) «Гемодилюция». У подопытных крыс производили взятие крови из бедренной вены в таком объеме, чтобы расчетный гематокрит после заместительно-

го введения физиологического раствора составил 30%, после чего сразу внутривенно (через ту же иглу) вводили подогретый до 37 °С физиологический раствор в объеме взятой крови. Исследование микроциркуляции проводили через 15 мин после инфузии. Сразу после этого забирали кровь для исследования вязкости и гематокрита из абдоминального сегмента задней полый вены.

Необходимый объем замещающей крови (V , мл) рассчитывали [7], исходя из объема циркулирующей крови (BV , мл), массы тела крысы (BW , г), объема клеточной массы (CV , мл) при заданном уровне гематокрита (Ht , %):

$$BV = 0.06 * BW + 0.77 \text{ (мл)}, \quad (1)$$

$$CV_{Ht} = (BV / 100) * Ht \text{ (мл)}, \quad (2)$$

$$V = (CV_{Ht0} - CV_{Ht1}) / Ht0 * 100 \text{ (мл)}, \quad (3)$$

где: $Ht0$ – исходный уровень гематокрита, $Ht1$ – уровень гематокрита, который требуется достичь для реализации модели.

Если масса тела крысы составляет 250 г, то согласно (1):

$$BV = 0.06 * 250 + 0.77 = 15.77 \text{ (мл)}.$$

При гематокрите 40% объем клеточной массы составит, согласно (2), $CV_{40\%} = 6.31$ мл, а при гематокрите 30% – $CV_{30\%} = 4.73$ мл.

Следовательно, для снижения гематокрита с 40% до 30% нужно было произвести взятие объема крови, согласно (3), в размере 3.95 мл.

Контрольное измерение гематокрита у каждой из крыс, выполненное после исследования микроциркуляции, показало, что гематокрит близок к расчётному (30%).

Группа 2 ($n = 32$) «Норма». Интактные животные с неизмененными значениями динамической вязкости крови и уровнем гематокрита.

Группа 3 ($n = 32$) «Эритроцитоз». Для получения эритроцитоза производили взятие крови из задней полый вены у крысы-донора в объеме 8 мл с последующим центрифугированием (об/мин – 3000; время центрифугирования – 5 мин), отделяли плазму и определяли гематокрит в осадке форменных элементов.

У крысы-реципиента производили взятие крови из бедренной вены, после чего сразу внутривенно (через ту же иглу) вводили клеточную массу крыс-доноров в объеме взятой крови. Необходимый объем рассчитывали таким образом, чтобы гематокрит составил 60%. Через 15 мин после введения осадка проводили измерение кровотока у крысы-реципиента. Сразу после этого забирали кровь для исследования вязкости и гематокрита из абдоминального сегмента задней полый вены.

Необходимый объем замещающей крови рассчитывали на основании формул (1) – (3). При гематокрите 60% объем клеточной массы, согласно (2), составит $CV_{60\%} = 9.46$ мл. Разница между объемом клеточной массы при уровне гематокрита 40% и 60% составляет 3.15 мл.

После центрифугирования крови крысы-донора получали клеточную массу с гематокритом 85–95%. Расчет замещаемого объема крови для реализации модели с гематокритом 60% проведен согласно выражению (3) с учетом гематокрита в полученной клеточной массе:

$$V = (CV_{60\%} - CV_{40\%}) / Ht_{90\%} * 100 \text{ (мл)} \quad (4)$$

Таким образом, согласно (4), для получения модели «Эритроцитоз» необходимо было заменить эритроцитарной массой 3.5 мл крови у каждого животного.

Контрольное измерение гематокрита после исследования микроциркуляции показало, что гематокрит у экспериментальных животных близок к расчётным значениям (60%).

Измерение показателей микроциркуляции кожи крыс

Измерение кровотока в МЦР кожи крыс проводили методом ВУЗД с помощью ультразвукового диагностического аппаратно-программного комплекса (АПК) «Минимакс-Допплер-К» (ООО «СП-Минимакс», Россия). Наркотизированных крыс помещали на термостатируемый столик Physitemp TCAT-2LV с ректальным датчиком температуры для контроля и поддержания постоянной температуры тела животных в период проведения эксперимента. В течение эксперимента ректальная температура составляла -37.3 ± 0.2 °С. Перед проведением измерений кожу крыс в области левого бедра механически очищали от шерсти.

Измерения преимущественно капиллярного наполнения сосудов МЦР проводили в режиме работы прибора «Минимакс-Допплер-К» – «микро». Ультразвуковой датчик с рабочей частотой 20 МГц, установленный на регулируемом штативе, располагали под углом 60° по отношению к коже. Для обеспечения акустического контакта между ультразвуковым датчиком и исследуемым участком использовали гель «Аквагель» для ультразвука (ООО «Десмо», Россия).

При записи сигнала проводили качественный анализ (визуально) доплерограммы в режиме реального времени. Все расчеты выполняются автоматически в программном обеспечении доплерографа. Полный перечень количественных характеристик кровотока представлен в табл. 1. Исследование скорости кровотока в МЦР у каждого животного проводилась трехкратно.

Таблица 1. Количественные характеристики кровотока, автоматически рассчитываемые программным обеспечением доплерографа

Обозначение, единицы измерения	Наименование
V_s , см/с	максимальная систолическая скорость
V_{as} , см/с	средняя систолическая скорость
V_m , см/с	средняя скорость по кривой максимальной скорости
V_{am} , см/с	средняя скорость
V_{ad} , см/с	средняя диастолическая скорость
V_{akd} , см/с	конечная диастолическая скорость
Q_s , мл/мин	объемная систолическая скорость
Q_{as} , мл/мин	объемная средняя систолическая скорость
Q_{am} , мл/мин	объемная средняя скорость
PI	индекс тонуса сосудов (Гослинга)
RI	индекс сопротивления сосудов (Пурсело)

Проводился анализ гистограмм распределения клеток крови (ГРКК) по скоростям. Гистограмма представлена на экране прибора после автоматической обработки спектральных характеристик сигнала и описывает распределение частиц по скоростям в исследуемом объеме ткани. Каждый из столбиков гистограммы обозначает долю клеток крови в определенном диапазоне скоростей по отношению ко всем клеткам крови, принятым за 100%, где верхняя граница – это текущее значение V_s . В гистограмме обозначается количество клеток крови в: L – количество клеток крови в диапазоне низких

скоростей (от 0 до $0.25 * V_s$), ML – количество клеток крови в диапазоне средненизких скоростей (от $0.25 * V_s$ до $0.5 * V_s$), MH – количество клеток крови в диапазоне средне-высоких скоростей (от $0.5 * V_s$ до $0.75 * V_s$), H – количество клеток крови в диапазоне высоких скоростей (от $0.75 * V_s$ до V_s).

Показано, что при распределении клеток крови по скоростям в каждом из диапазонов скоростей присутствуют различные гидродинамические механизмы, поэтому ГРКК по скоростям потенциально значима для методики неинвазивного исследования реологических свойств крови.

Измерение относительной вязкости крови

Исследование динамической вязкости крови *in vitro* проводились на вибрационном вискозиметре SV-1A (AND, Япония). Каждый раз перед определением вязкости опытного образца производили калибровку прибора по дистиллированной воде контролируемой температуры ($36\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Для исследования цельную гепаринизированную кровь объемом 2 мл, полученную из задней полый вены наркотизированной крысы, помещали в одноразовую пластиковую пробирку объемом 5 мл (Eppendorf Austria GmbH, Австрия). Затем пробирку помещали на предметный столик в специальное крепление, которое устанавливалось в водяную «рубашку». Водяную «рубашку» при помощи силиконовых трубок с внутренним диаметром 8 мм подключали к термостатирующей прецизионной бане LB-216 (АО «Лабораторное Оборудование и Приборы», Россия) с точностью поддержания температуры $37.0 \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, что обеспечивало высокую точность поддержания температуры объектов внешнего контура. В качестве теплоносителя использовали дистиллированную воду. Пространство между пробиркой и внутренними стенками «рубашки» также заполняли теплоносителем. Температуру устанавливали $38\text{ }^{\circ}\text{C}$, что обеспечивало сравнительно быстрый нагрев образца без риска термического повреждения белковых структур. Сенсорные пластины погружали в образец таким образом, чтобы уровень поверхности образца находился на уровне центра узкой части пластин, между треугольными метками, и пластины были в центре пробирки. Так как кровь непрозрачная жидкость, для точной регулировки положения пластин относительно уровня крови использовали ограничитель и стандартный объем (2 мл). Далее по достижении температуры образца $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ производили серию измерений, выключив водяную баню для исключения дополнительной вибрации. Таким образом, температура образца при измерении составляла $35\text{--}35.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для быстрой оценки гематокрита, а также для образцов с гематокритом более 55% 70 мкл гепаринизированной цельной крови, полученный, как описано выше, центрифугировали при помощи центрифуги Армед SH120–1S (Китай) в стеклянных капиллярах (об/мин – 7000; время центрифугирования – 5 мин). Оценивали гематокрит с учетом оседания столбика форменных элементов при помощи карточного гематокритного ридера.

Статистическая обработка данных

Обработка данных проводилась в 2 этапа. На первом этапе оценивали качество реализованных моделей (наличие статистически достоверных различий между значениями динамической вязкости крови и гематокрита между группами) и различия между группами по данным ВУЗД. Для этого использовали непараметрический критерий Манна-Уитни для несвязанных групп с принятым уровнем значимости $p < 0.05$. На втором этапе проводили статистический анализ характеристик, зарегистрированных ВУЗ доплерографом при измененной вязкости крови. Для этого при помощи линейного дискриминантного анализа с последовательным включением показателей выявляли наиболее значимые характеристики для совокупности трех групп. При помощи однофакторного дисперсионного

анализа с принятым уровнем значимости $p < 0.05$ выявляли значимость различий этих характеристик. Расчеты выполнены в пакете прикладных программ STATISTICA 13.0. В статье данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичный статистический анализ показал корректность выполнения моделей. Показатели крови животных всех трех групп статистически достоверно различались как по значению динамической вязкости крови, так и по уровню гематокрита (табл. 2).

Таблица 2. Гемореологические показатели крови крыс различных групп

Группа крыс	Относительный коэффициент вязкости, мПа*с	Гематокрит, %
группа 1 «Гемодилюция»	$1.99 \pm 0.02, p < 0.001$	$31.48 \pm 0.31, p < 0.001$
группа 2 «Норма»	2.84 ± 0.03	41.6 ± 0.3
группа 3 «Эритроцитоз»	$3.95 \pm 0.04, p < 0.001$	$54.56 \pm 0.23, p < 0.001$

Различия представлены относительно группы 2 «Норма»

В табл. 3 представлены характеристики кровотока в МЦР кожи крыс группы 2 («Норма») по данным ВУЗД, с которой проводили сравнение показателей кровотока у групп с измененными реологическими показателями крови. Поскольку исследование скорости кровотока в МЦР у каждого животного проводилась трехкратно, далее показатель (n) в группах указывает на количество проведенных измерений.

Таблица 3. Характеристики кровотока в МЦР в группе «Норма» ($n = 96$)

Показатель, единицы измерения	значение ($M \pm SEM$)
L' , %	44.28 ± 2.59
ML' , %	38.51 ± 1.74
MF' , %	9.98 ± 1.12
F' , %	7.26 ± 2.09
V_s , см/с	1.05 ± 0.04
V_{as} , см/с	0.27 ± 0.01
V_m , см/с	0.25 ± 0.02
V_{am} , см/с	0.09 ± 0.01
V_{ad} , см/с	0.13 ± 0.01
V_{akd} , см/с	0.1 ± 0.01
Q_s , мл/мин	0.82 ± 0.03
Q_{as} , мл/мин	0.21 ± 0.01
Q_{am} , мл/мин	0.11 ± 0.01
PI	3.67 ± 0.33
RI	0.88 ± 0.02

В группе «Гемодилюция» ($n = 63$) были статистически значимо выше, чем в группе «Норма» следующие характеристики кровотока: V_{as} (0.35 ± 0.02 см/с, $Z = -2.64$, $p < 0.01$), Q_{as} (0.27 ± 0.01 мл/мин, $Z = -2.64$, $p < 0.01$).

В группе с модельным «Эритроцитозом» ($n = 96$) кровоток характеризовался более высокими скоростями во всех звеньях МЦР: V_{as} (0.37 ± 0.03 см/с, $Z = -4.96$, $p < 0.001$), V_{am} (0.13 ± 0.01 см/с, $Z = -3.93$, $p < 0.001$), V_{akd} (0.14 ± 0.01 см/с, $Z = -3.41$, $p < 0.001$), Q_{as} (0.29 ± 0.01 мл/мин, $Z = -4.96$, $p < 0.001$), PI (4.12 ± 0.3 , $Z = -2.37$, $p = 0.02$), RI (0.96 ± 0.01 , $Z = -3.52$, $p < 0.001$) и более низким значением V_{ad} (0.1 ± 0.11 см/с, $Z = 2.68$, $p < 0.01$).

Таким образом, взаимосвязь гемореологии и микроциркуляции находит свое отражение в исследованиях с использованием ВУЗД.

Получаемые после проведения ВУЗД значения ГРКК по скоростям являются зависимыми от значения V_s в каждом измерении. Поэтому потребовалось приведение всех относительных значений ГРКК к единой абсолютной шкале для всех измерений, выполненных на животных всех модельных групп. За основу были приняты данные группы 2 («Норма»). В качестве верхней фиксированной границы принималось максимальное значение показателя V_s в данной выборке, которое соответствовало 1.6 см/с. Пересчет значений был проведен в разработанном на основе *MS excel* шаблоне, и далее значения ГРКК обозначены как: L' , ML' , MH' , H' .

Несмотря на отсутствие статистической значимости по показателям ГРКК в группах 1 и 3 относительно группы 2 «Норма», представляет интерес вид гистограмм распределения клеток крови по скоростям, так как присутствовали различия между группами 1 и 3.

По данным ВУЗД, животные группы 1 модель «Гемодилюция» характеризовались преобладанием кровотока в диапазоне низких скоростей (рис. 1).

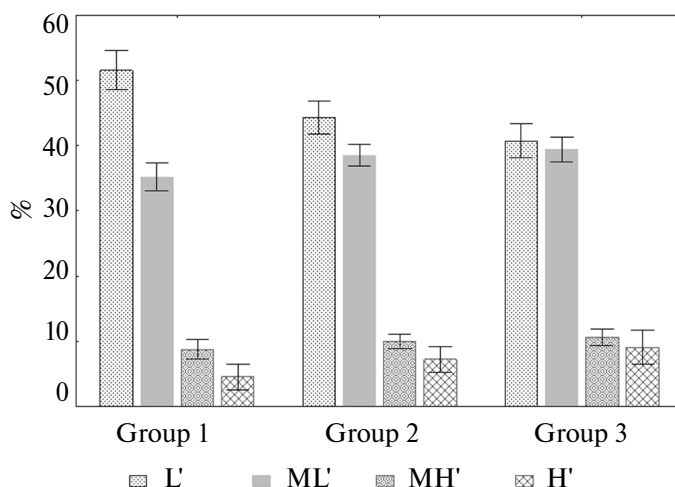


Рис. 1. Распределение клеток крови по скоростям в модельных группах. L' – диапазон низких скоростей, ML' – диапазон средненизких скоростей, MH' – диапазон средневисоких скоростей, H' – диапазон высоких скоростей.

С целью определения зависимостей между вязкостью крови и характеристиками кровотока был применен дискриминантный анализ [8]. Это математический метод, который используется для анализа и классификации данных. Он позволяет определить, какие переменные или признаки наиболее сильно влияют на разделение объектов на различные группы или классы. Цель дискриминантного анализа заключается в построении дискриминантной функции, которая может разделить объекты на различные классы на основе их характеристик или признаков. В нашем случае в дискриминантный анализ были заложены данные по 3 группам «Гемодилуция», «Норма», «Эритроцитоз».

Задачами анализа явились:

- статистическое выявление наиболее значимых показателей кровотока в МЦР по данным ВУЗД в зависимости от измененных реологических свойств крови, путем анализа совокупности данных по трем модельным группам;
- выявление уровня их влияния.

Составлены таблицы данных, структура которых аналогична изложенной в работе [9]. В первом столбце отражена информация о группе (1, 2 или 3), затем представлены 15 характеристик кровотока в порядке, соответствующим их представлению в табл. 3, и данные о динамической вязкости крови и уровне гематокрита, представленных в табл. 2.

Автоматический пошаговый расчет дискриминантной функции в виде линейной комбинации всех характеристик кровотока в каждой группе позволил выявить наиболее значимые характеристики кровотока в МЦР, которые изменяются в зависимости от измененного состава крови. К ним относятся: средняя систолическая скорость V_{as} ($F=6.72$, $p < 0.01$), средняя скорость V_{am} ($F=16$, $p < 0.001$), средняя объемная скорость Q_{am} ($F=7.39$, $p < 0.001$), индекс сопротивления сосудов RI ($F=7.07$, $p < 0.01$) и процентное содержание клеток крови, движущихся в диапазоне низкой скорости L' ($F=3.7$, $p = 0.03$).

Проверка достоверности выбранных характеристик с использованием однофакторного дисперсионного анализа подтвердила их значимость в определении принадлежности к группе «Гемодилуция», «Норма» или «Эритроцитоз» по данным ВУЗД.

На рис. 2 представлены графики распознавания образов 3 групп, которые складываются из 5 наиболее значимых характеристик кровотока в МЦР, полученных методом ВУЗД. На графиках представлены границы доверительного интервала с достоверностью 95% и средние показатели значений по всем 3 группам.

На основе однофакторного дисперсионного анализа сформированы классификационные функции для неинвазивного определения динамической вязкости крови (η , мПа*с) по данным ВУЗД, которые представляют собой 3 выражения:

$$\eta_1 = -56.0584 + 0.1634 * L' + 4.8991 * V_{as} + 22.5064 * V_{am} + 68.9376 * Q_{am} + 100.2742 * RI, \quad (5)$$

$$\eta_2 = -53.1244 + 0.1468 * L' - 1.1019 * V_{as} + 11.6543 * V_{am} + 81.2057 * Q_{am} + 100.2501 * RI, \quad (6)$$

$$\eta_3 = -61.8928 + 0.1418 * L' + 3.1034 * V_{as} + 34.8149 * V_{am} + 70.5314 * Q_{am} + 106.668 * RI \quad (7).$$

При подстановке значений величин L' , V_{as} , V_{am} , Q_{am} и RI , полученных методом ВУЗД, во все три выражения (5) – (7) следует выбрать максимальное значение из трех. Именно оно будет близко либо соответствовать истинному значению вязкости крови и определять принадлежность к группе 1, 2 или 3.

Классификационные функции являются современной технологией анализа данных, что, по сути, представляет элемент искусственного интеллекта, внедрение которого проводится на современном этапе во всех сферах деятельности.

Из графиков видно, что если показатели ВУЗД: V_{as} , V_{am} и RI выше верхней границы доверительного интервала, то с достоверностью 95% объект принадлежит к груп-

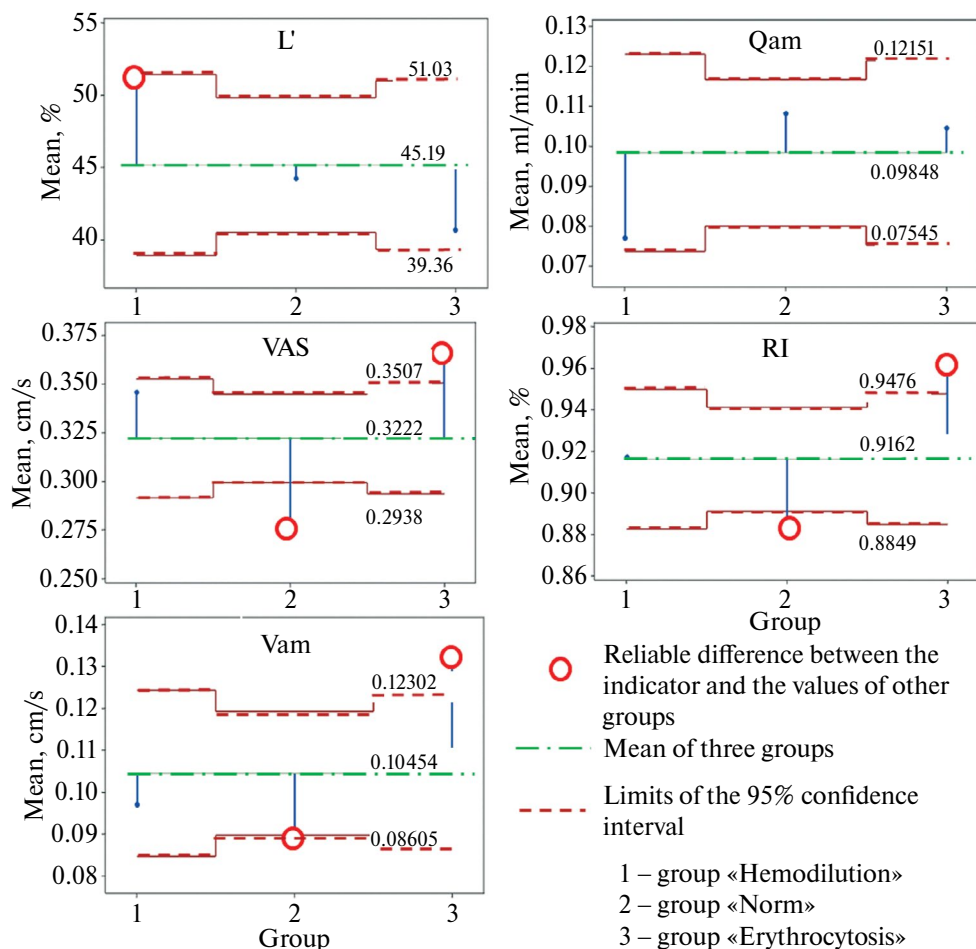


Рис. 2. Графики распознавания групп «Гемодилюция», «Норма» и «Эритроцитоз» по данным высокочастотной ультразвуковой доплерографии.

пе «Эритроцитоз». Если эти показатели ниже доверительной границы, следовательно, объект принадлежит к группе «Норма» (с достоверностью 95%). Для группы «Гемодилюция» характерным является показатель L' у верхней границы доверительного интервала и Q_{am} у нижней границы доверительного интервала. Следует отметить, что направление данных показателей является противоположным для групп 2 и 3.

Следовательно, чем меньше вязкость, тем медленнее будут двигаться форменные элементы крови по сосудам МЦР. При этом объемный поток крови через МЦР также будет снижен. Такое состояние будет неблагоприятно сказываться на сердечно-сосудистой системе в целом, так как при снижении количества эритроцитов, составляющих большую часть клеток крови, снабжение органов и тканей кислородом также будет

снижено. Реакцией организма на гипоксию может стать усиление работы сердца, что, как следствие, приведет к ряду компенсаторных реакций в МЦР [10, 11].

При повышенной вязкости крови группы 3 «Эритроцитоз» характерным является снижение значения показателя L' и более высокие показатели кровотока в артериальном и капиллярном звеньях МЦР, однако не отмечается высоких показателей объемного кровенаполнения капиллярного звена, достоверно увеличивается показатель периферического сопротивления сосудов. Вследствие этого, можно предполагать, застойные явления в веноулярном отделе МЦР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система микроциркуляции является сложной, очень мобильной, многофакторной системой [12]. Скорость движения потоков крови находится в прямой зависимости от реологических свойств крови и плазмы [13, 14], количества, состава ее форменных элементов [1, 15].

Нами проведено исследование взаимосвязи реологических свойств крови с характеристиками скорости кровотока в различных звеньях МЦР методом ВУЗД на трех моделях «Гемодилюция», «Норма», «Эритроцитоз» с использованием животных. Также проводилось статистическое выявление наиболее значимых показателей кровотока в МЦР по данным ВУЗД в зависимости от измененных реологических свойств крови с помощью современной технологии анализа многокомпонентных данных.

Проведенный анализ продемонстрировал возможность применения статистических методов анализа для неинвазивного определения реологических свойств крови с помощью ВУЗД. Эффективность примененного метода дискриминантного анализа в задачах классификации, используемых в медицинских и диагностических целях, была подтверждена неоднократно [16, 17], включая исследования с ВУЗД [18].

С помощью однофакторного дисперсионного анализа была построена экспертная система оценки реологических свойств крови по характеристикам кровотока в разных звеньях МЦР, полученных методом ВУЗД для групп животных: «Гемодилюция», «Норма», «Эритроцитоз». Особенно ценно, что достоверные различия определены в базовых значениях системы МЦР: артериальном, капиллярном звеньях и системе периферического сопротивления сосудов.

Возможность построения данной экспертной системы реализуется и для других патологий. Внедрение экспертной оценки реологических показателей крови в программном обеспечении ультразвукового доплерографа даст возможность исследования макрореологических свойств крови методом ВУЗД.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н. Н. П. и М. А. С.), сбор данных (Т. Г. Г., С. Г. Ч.), обработка данных (А. А. К., А. М. Н.), написание и редактирование манускрипта (Н. Н. П., М. А. С, Т. Г. Г., С. Г. Ч., А. А. К., А. М. Н.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета соглашения о научно-исследовательском сотрудничестве № 37-С от 09 февраля 2023 г. между обществом с ограниченной ответственностью «Центр авиакосмической медицины» и Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, программы фундаментальных научных исследований РАН FMFR-2024–0039, запланированных в ГНЦ РФ-ИМБП 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 содержанию и использованию животных Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 100_ЦЛ1_012024/24_135 от 15.01.2024 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Муравьев АВ, Михайлов ПВ, Тихомирова ИА* (2017) Микроциркуляция и гемореология: точки взаимодействия. Регион кровообращ микроцикул 16(2): 90–100. [*Muravyov AV, Mikhailov PV, Tikhomirova IA* (2017) Microcirculation and Hemorheology: points of interaction. Region krovoobrashchh mikrocirkul 16(2): 90–100. (In Russ)]. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2017-16-2-90-100>
2. *Alsunaidi B, Althobaiti M, Tamal M, Albaker W, Al-Naib I* (2021) A review of non-invasive optical systems for continuous blood glucose monitoring. *Sensors* 21(20): 6820. <https://doi.org/10.3390/s21206820>
3. *Apostolidis AJ, Beris AN* (2014) Modeling of the blood rheology in steady-state shear flows. *J Rheol* 58(3): 607–633. <https://doi.org/10.1122/1.4866296>
4. *Njoum H, Kyriacou PA* (2017) Photoplethysmography for the Assessment of Haemorheology. *Scient Rep* 7(1): 1406. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01636-0>
5. *Khlynov RD, Ryzhova VA, Konyakhin IA, Korotaev VV* (2022) Robotic Polarimetry System Based on Image Sensors for Monitoring the Rheological Properties of Blood in Emergency Situations. In: Gorodetskiy AE, Tarasova IL (eds) *Smart Electromechanical Systems. Studies in Systems, Decision and Control*. Vol 419. Springer. Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-97004-8_15
6. *Гришачева ТГ, Петрищев НН, Скедина МА, Ковалева АА* (2023) Изучение возможности оценки гемореологических свойств крови на основе гистограммы распределения клеток крови по скоростям. В: Власов ТД, Петрищев НН (ред) *Научная интеграция в биомедицине: фундаментальные и прикладные аспекты*. ПСПбГМУ им ИП Павлова. Санкт-Петербург 258–271. [*Petrishchev NN, Skedina MA, Grishacheva TG, Kovaleva AA* (2023) Possibility to study blood rheological properties by high-frequency ultrasound dopplerography. In: Vlasov TD, Petrishchev NN (eds) *Scientific integration in biomedicine: fundamental and applied aspects*. Pavlov University. Saint Petersburg. 258–271. (In Russ)].
7. *Lee HB, Blaufox MD* (1985) Blood volume in the rat. *J Nucl Med* 26(1): 72–76.
8. *Dhamnetiya D, Goel MK, Jha RP, Shalini S, Bhattacharyya K* (2022) How to perform discriminant analysis in medical research? Explained with illustrations. *J Labor Physicians* 14(04): 511–520. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1747675>
9. *Скедина МА, Ковалева АА, Носовский АМ* (2020) Анализ показателей кровотока в микроциркуляторном русле кожи человека и их связь с показателями центральной гемодинамики. Регион кровообращ микроцикул 19(4): 76–86. [*Skedina MA, Kovaleva AA, Nosovskij AM* (2020) The analysis of blood flow indicators in the microvascular bed of the human skin and their relationship with central hemodynamic parameters. Region krovoobrashchh mikrocirkul 19(4):76–86. (In Russ)]. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2020-19-4-76-86>
10. *Шперлинг ИА, Крупин АВ, Рогов ОА, Шперлинг НВ, Арокина НК* (2023) Функциональные особенности кардиореспираторной системы у крыс с острой кровопотерей и после ее восполнения инфузионным раствором в эксперименте. *Вятск мед вестн* 79(3): 59–65. [*Shperling IA, Krupin AV, Rogov OA, Shperling NV, Arokina NK* (2023) Functional peculiarities of the cardiorespiratory system in rats with acute blood loss and after its replenishment with infusion solution in the experiment. *Vyatsk med vestn* 79(3): 59–65. (In Russ)]. <https://doi.org/10.24412/2220-7880-3-59-65>

11. Умралиева НД, Сотников БВ, Тулеев ТМ (2022) Влияние высокогорья на микрогемоциркуляцию крыс с гемической гипоксией. Вестн мед и образован (3):154–172. [Umralieva ND, Sotnikov BV, Tulekeev TM (2022) Influence of high mountains on microhemocirculation of rats with hemic hypoxia. Vestn med i obrazovan (3): 154–172. (In Russ)].
12. Gutterman DD, Chabowski DS, Kadlec AO, Durand MJ, Freed JK, Ait-Aissa K, Beyer AM (2016) The human microcirculation: regulation of flow and beyond. *Circul Res* 118(1): 157–172. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.305364>
13. Alexy T, Detterich J, Connes P, Toth K, Nader E, Kenyeres P, Arriola-Montenegro J, Ulker P, Simmonds MJ (2022) Physical Properties of Blood and their Relationship to Clinical Conditions. *Front Physiol* 13: 906768. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.906768>
14. Sun J, Han K, Xu M, Li L, Qian J, Li L, Li X (2022) Blood Viscosity in Subjects With Type 2 Diabetes Mellitus: Roles of Hyperglycemia and Elevated Plasma Fibrinogen. *Front Physiol* 13: 827428. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.827428>
15. Beris AN, Horner JS, Jariwala S, Armstrong MJ, Wagner NJ (2021). Recent advances in blood rheology: a review. *Soft Matter* 17(47): 10591–10613. <https://doi.org/10.1039/d1sm01212f>
16. Ватьян АС, Голубев АА, Гусарова НФ, Добренко НВ, Зубаненко АА, Кустова ЕС, Татаринова АА, Томилов ИВ, Шовкопляс ГФ (2023) Интеллектуальная поддержка клинических решений при небольших выборках числа пациентов. Научно-техн вестн информац технол механ и оптики 23(3): 595–607 [Vatyay AS, Golubev AA, Gusarova NF, Dobrenko NV, Zubanenko AA, Kustova ES, Tatarinova AA, Tomilov IV, Shovkopliash GF (2023) Intelligent clinical decision support for small patient datasets. *Nauchno-tekhn vestrn informac tekhnol mekhan i optiki* 23(3): 595–607. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2023-23-3-595-607>
17. Николаева НГ, Шадривова ОВ, Борзова ЮВ, Григорьев СГ, Ицкович ИЭ, Клишко НН (2023) Возможности дискриминантного анализа в дифференциальной диагностике хронического аспергиллеза и немикотических поражений легких. Вестн рентгенол радиол 104(1): 6–20. [Nikolaeva NG, Shadrivova OV, Borzova YuV, Grigoryev SG, Itskovich IE, Klimko NN (2023) Possibilities of Discriminant Analysis in the Differential Diagnosis of Chronic Aspergillosis and Nonmicotic Lung Lesions. *Vestrn rentgenol i radiol* 104(1): 6–20. (In Russ)]. <https://doi.org/10.20862/0042-4676-2023-104-1-6-20>
18. Токмакова СИ, Кириенкова ЕА, Бондаренко ОВ, Луницына ЮВ, Побединская ЛЮ, Баштовой АА (2021) Оценка микрогемоциркуляции тканей пародонта на основе применения метода дискриминантного анализа. Институт стоматол 90(1): 62–64 [Tokmakova SI, Kirienkova EA, Bondarenko OV, Lunicyna YuV, Pobedinskaya LYu, Bashtovoy AA (2021) Evaluation of microhemocirculation of periodontal tissues based on the use of the discriminant analysis method. *Institut stomatol* 90(1): 62–64. (In Russ)].

The Relationship of Hemorheological Blood Values and Blood Velocity of Microcirculatory Bloodstream in Rats' Skin Vessels

N.N. Petrishchev^a, M.A. Skedina^b, T.G. Grishacheva^{a, #}, S.G. Chefu^a, A.A. Kovaleva^b,
and A. M. Nosovskij^b

^a*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia*

^b*Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: laser82@mail.ru*

Non-invasive study of blood rheology is relevant, but quite complex issue. When systemic blood viscosity and hematocrit levels deviate, blood flow indicators in different parts of microvasculature change. Purpose of the study – research of blood flow characteristics in skin microcirculatory bloodstream of rats obtained by high-frequency ultrasound Dopplerography (HFUD) with given changes in rheological blood indicators. The studies were carried out on pubescent male Wistar rats. 3 experimental groups were formed. Group 1 ($n = 21$) “Hemodilution” – viscosity 1.99 ± 0.02 mPa*s, hematocrit $31.48 \pm 0.31\%$. Group 2 ($n = 32$) “Reference values” – animals with unchanged blood levels – viscosity 2.84 ± 0.03 mPa*s, hematocrit $41.60 \pm 0.3\%$. Group 3 ($n = 32$) “Erythrocytosis” – viscosity 3.95 ± 0.04 mPa*s, hematocrit $54.56 \pm 0.23\%$. Dynamic blood viscosity in vitro studies were carried out on oscillatory viscometer. In order to evaluate hematocrit level heparinized whole blood was centrifuged in glass capillaries using; hematocrit values were assessed taking into account sedimentation of formed elements column using a hematocrit reader card. Blood flow in skin microcirculatory bloodstream of rats' left thigh area was estimated by HFUD method using Minimax-Doppler-K hardware and software system, with ultrasound transducer (frequency 20 MHz). Statistical analysis showed the models are correct. Blood indicators of the animals in three experimental groups differed statistically and significantly in terms of blood viscosity and hematocrit. Discriminant analysis was used to determine the relations between rheological blood parameters and characteristics of blood velocity in microcirculatory bloodstream which made it possible to identify the most significant characteristics of blood flow that tend to change depending on altered blood composition. These include: mean systolic velocity V_{as} ($p < 0.01$), mean velocity V_{am} ($p < 0.001$), mean volume velocity Q_{am} ($p < 0.001$), vascular resistance index RI ($p < 0.01$) and the percentage of blood cells moving in low-speed H' ($p = 0.03$). The reliability of selected characteristics was checked with one-way analysis of variance; and their significance in determining membership in “Hemodilution”, “Reference values” or “Erythrocytosis” groups according to HFUD data was confirmed. Based on this analysis classification functions were generated for non-invasive dynamic blood viscosity determination according to ultrasound Dopplerography data.

Keywords: blood, hemorheology, blood viscosity, hematocrit, microcirculation, ultrasound examination

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ОБЪЕДИНЕНИЕ МЕТОДОВ ОДНОФОТОННОЙ МИНИАТЮРНОЙ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ И ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ
РЕГИСТРАЦИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ
ГИППОКАМПА *IN VIVO***

© 2024 г. А. И. Ерофеев^{1, *}, Е. К. Винокуров¹, И. Е. Антифеев², О. Л. Власова¹,
И. Б. Безпрозванный^{1, 3}

¹Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Институт
биомедицинских систем и биотехнологий, Санкт-Петербург, Россия

²Институт аналитического приборостроения, Санкт-Петербург, Россия

³Отделение физиологии, Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, Даллас,
Техас, США

*E-mail: alexandr.erofeev@gmail.com

Поступила в редакцию 21.04.2024 г.

После доработки 06.06.2024 г.

Принята к публикации 04.07.2024 г.

Однофотонный миниатюрный флуоресцентный микроскоп (минископ) позволяет визуализировать кальциевую активность *in vivo* у свободно передвигающихся лабораторных животных, обеспечивая возможность отслеживания клеточной активности в ходе изучения процессов формирования памяти, обучения, сна и социального взаимодействия. Однако использование кальциевых сенсоров для прижизненной визуализации имеет ограничения, связанные с их относительно медленной (миллисекундной) кинетикой, что осложняет регистрацию высокочастотной спайковой активности. Интеграция методов однофотонной миниатюрной флуоресцентной микроскопии с электрофизиологической регистрацией, обладающей микросекундным разрешением, представляет собой потенциальное решение этой проблемы. Такое сочетание методов дает возможность одновременной регистрации оптической и электрофизиологической активности на одном животном *in vivo*. В данном исследовании разработан гибкий полиимидный микроэлектрод, который был совмещен с градиентной линзой минископа. Проведенные в исследовании тесты *in vivo* подтвердили, что совмещенный с градиентной линзой микроэлектрод реализует одновременную однофотонную кальциевую визуализацию и регистрацию локальных полевых потенциалов в гиппокампе взрослой мыши.

Ключевые слова: гиппокамп, визуализация кальция, минископ, электрофизиология, микроэлектроды, *in vivo*

DOI: 10.31857/S0869813924070091, **EDN:** BDKVNM

СОКРАЩЕНИЯ И ТЕРМИНЫ

Измерители RLC – это приборы, используемые для измерения электрических параметров компонентов и цепей, таких как сопротивление (R), индуктивность (L) и емкость (C).

Локальные полевые потенциалы (ЛПП) – электрические сигналы, которые отражают суммарную активность популяций нейронов в определённой области мозга.

Минископ – однофотонный миниатюрный флуоресцентный микроскоп.

Парилен С (Поли-пара-ксилilen) – полимер, который широко используется как биосовместимое, устойчивое к коррозии покрытие в медицинских устройствах, электронике и др. Данный полимер оптически прозрачен, используется в виде пленок или покрытий благодаря своим хорошим диэлектрическим и теплоизоляционным свойствам, а также химической инертности.

Тетрод – это миниатюрный электрод, состоящий из нескольких проводников, обычно четырех, уложенных параллельно друг другу. Он используется в нейрофизиологических исследованиях для записи электрической активности нейронов в живых организмах.

Фотоэлектрический артефакт – это нежелательное искажение или помеха в измерениях или данных, вызванная воздействием света на оборудование или сенсоры.

Ca^{2+} – кальций.

GCaMP – генетически-кодируемые кальциевые индикаторы, тип интенсифицированных биосенсоров, используемых для обнаружения и измерения концентрации ионов кальция в живых клетках. Представляют собой слияние зеленого флуоресцентного белка (GFP), кальмодулина (CaM) и M13, пептидной последовательности из киназы легкой цепи миозина.

GRIN-линза (градиентно-индексная линза) – оптическая линза с изменяющимся по степени коэффициентом преломления вдоль своей оси. Этот тип линзы имеет специальную структуру, которая обеспечивает изменение показателя преломления от центра к краям линзы, что позволяет фокусировать свет на протяжении всей длины линзы.

PEDOT: PSS (поли(3,4-этилендиокситиофен): полистиролсульфонат) – это смесь полимеров, широко используемая в электронике и оптике благодаря своим уникальным электропроводным и оптическим свойствам. Этот материал обладает высокой проводимостью при комнатной температуре и хорошей прозрачностью в видимом спектре.

ВВЕДЕНИЕ

Визуализация кальция (Ca^{2+}) *in vivo* и электрофизиологическая регистрация нейронной активности с помощью микроэлектродов в живых организмах являются перспективными методами современной нейробиологии. Основной причиной объединения электрофизиологических методов с визуализацией кальция являются ограничения, связанные с использованием кальциевых индикаторов [1, 2], т.к. визуализация Ca^{2+} имеет низкое временное разрешение по сравнению с электрофизиологическими методами [3–5]. Кроме того, такое сочетание методов дает возможность регистрации разных типов активности (оптической и электрофизиологической) на одном животном *in vivo*.

Двухфотонная и однофотонная микроскопия – методы визуализации, широко используемые в биологических исследованиях для визуализации клеток и тканей с высоким разрешением. Каждый метод имеет свои уникальные особенности и области применения, обусловленные принципами поглощения фотонов и взаимодействия с биологическими образцами. Однофотонная микроскопия основывается на принципе поглощения одного фотона, необходимого для перевода молекулы из основного в возбужденное состояние. Для данного процесса необходимы фотоны с высокой

энергией (малой длиной волны), соответствующей разнице энергий между основным и возбужденным состояниями флуорофора. Возбужденные молекулы, в свою очередь, испускают фотоны меньшей энергии (большей длины волны), что сопровождается их возвращением в основное состояние, которое регистрируется для формирования изображения. Данный метод позволяет получать изображения образцов с высоким разрешением, но имеет ограничение по глубине проникновения (до 200 мкм) из-за рассеяния и поглощения более коротких длин волн в биологических тканях [6]. Двухфотонная микроскопия основана на принципе одновременного поглощения двух фотонов меньшей энергии (большей длины волны) для возбуждения молекулы из основного состояния в возбужденное, этот процесс известен как «двухфотонный эффект» [7]. Ключевые преимущества двухфотонной микроскопии по сравнению с однофотонной включают высокую проникающую способность (до 1 мм), обусловленную меньшим рассеянием и поглощением более длинных волн, а также более высокое разрешение и скорость сканирования. Благодаря нелинейному характеру двухфотонного поглощения возбуждение флуорофоров ограничено областью фокальной точки, что снижает фотообесцвечивание и фотоповреждение образца за пределами фокальной области [8]. Вследствие этих характеристик двухфотонная микроскопия наиболее широко применяется для прижизненной кальциевой визуализации [7, 9, 10].

Для электрофизиологической регистрации применяются микроэлектроды из различных токопроводящих материалов, например, меди, золота, алюминия и титана [11], а также матрицы на основе углеродных нанотрубок и графена [12, 13]. В качестве подложек могут использоваться гибкие полимеры [11], которые выполняют защитную и диэлектрическую функцию, а в качестве жесткой подложки – кремний. При этом микроэлектроды возможно комбинировать в микроэлектродные массивы, включающие до тысяч контактов [14]. При использовании микроэлектродов в нейробиологических исследованиях для токопроводящих материалов и для полимерных подложек важны такие свойства, как биосовместимость и устойчивость к коррозии. В свою очередь, проводимость материала, а также конструкция и геометрия микроэлектродов определяют импеданс и пространственную разрешающую способность.

Импеданс – это мера сопротивления микроэлектрода переменному току. В нейробиологических исследованиях *in vivo* на нейронных популяциях импеданс измеряется в диапазонах частот от 0.1 до 1000 Гц. Низкие значения импеданса являются важной характеристикой для записи нейронной активности, так как значения выше 5 МΩ могут вызывать шумы и затухание сигнала [15]. Важно учитывать, что значение импеданса можно снизить за счет увеличения эффективной площади и шероховатости поверхности микроэлектрода при гальваническом покрытии и осаждении проводящими полимерами PEDOT и PEDOT/PSS [16], платиновой чернью [17] и оксидом иридия [18]. Измерение импеданса микроэлектрода происходит с помощью RLC-метра по методу автоматической балансировки электрического моста [19].

Также важной характеристикой микроэлектродов, определяющей точность локализации нейронной активности, является пространственная разрешающая способность, которая зависит от плотности размещения контактов электродов, их конструкции и диаметра токопроводящих дорожек [20]. Металлические контакты микроэлектродов для электрофизиологических записей имеют диаметр от 10 до 200 мкм и межэлектродное расстояние от 10 до 500 мкм в зависимости от типа микроэлектродов, исследуемой области и типа сигнала [21].

В качестве жесткой подложки при изготовлении микроэлектродов часто используют кремний. Однако такие микроэлектроды обладают недостаточной прочностью и могут вызывать воспалительные реакции [22]. По этой причине появились микроэлектроды на гибкой полимерной подложке, которые более биосовместимы и подходят для хронической имплантации в мозг, кроме того, они лучше адаптируются под движение ткани, что помогает избежать повреждения [23]. Для гибких микроэлектродов

используют такие материалы, как SU-8 (покрытие на основе эпоксидной смолы) [24], парилен-С (органический гидрофобный полимер с высокой биосовместимостью) [25], PDMS (силикон) [26] и полиимид (химически и термически стабильный биосовместимый полимер) [27].

Полиимидные микроэлектроды активно используются в нейробиологических исследованиях благодаря своей биосовместимости, диэлектрической прочности и гибкости, превосходящей хрупкие микроэлектроды на основе кремния [11]. В частности, микроэлектроды на основе полиимида стали применять для регистрации локальных полевых потенциалов. ЛПП, получаемые путем низкочастотной фильтрации исходного сигнала, регистрируемого микроэлектродами, в основном отражают синаптическую активность популяции нейронов вокруг микроэлектрода [28].

В ходе экспериментов полиимидные микроэлектроды обеспечили надежную хроническую нейронную запись у лабораторных грызунов, продемонстрировав практическое применение и долговечность в течение нескольких недель после операции [23, 29]. Их механическая и электрическая стабильность была подтверждена после длительного воздействия фосфатно-солевого буфера и испытаниями *in vivo*, что свидетельствует об их долговечности [30]. Кроме того, у микроэлектродов на основе полиимида отсутствует фотоэлектрический эффект в отличие от кремниевых микроэлектродов [31].

В качестве токопроводящего материала для микроэлектродов часто используют медь из-за ее доступности и высокой электрической проводимости (5.96×10^7 См/м), однако данный материал обладает плохой биосовместимостью и склонен к окислению [32], поэтому дополнительно токопроводящие дорожки могут гальванировать золотом, которое нетоксично, широко используется в медицине и устойчиво к коррозии [33].

На данный момент разработано несколько видов микроэлектродов для совмещения двухфотонной визуализации и электрофизиологической регистрации [34–40], например, для электрокортикографии (ЭКоГ) [41]. В одной из работ [36] использовались прозрачные графеновые микроэлектроды и конфокальная двухфотонная микроскопия для одновременной визуализации кальция и регистрации нейронной активности в переживающих срезах гиппокампа. В другом исследовании [37] была проведена одновременная двухфотонная визуализация и регистрация кортикальной активности *in vivo* с использованием прозрачных графеновых микроэлектродов, нанесенных на оптически прозрачную подложку из парилена-С [42, 43]. Также в одной из статей [38] был описан прозрачный массив микроэлектродов, выполненных из тонких пленок в форме сети углеродных нанотрубок, для сочетания с двухфотонной микроскопией, что позволило успешно выявить корреляцию между сигналом ЭКоГ и двухфотонной кальциевой визуализацией в иктальном состоянии. В других исследованиях [39, 40] сообщалось о применении прозрачного кортикального массива микроэлектродов из полимера PEDOT: PSS для одновременной электрофизиологической регистрации и кальциевой визуализации с помощью двухфотонной микроскопии. Дополнительные сведения о прозрачных микроэлектродах можно найти в обзорах Kuzum с соавт. [36] и Cho с соавт. [44].

Однако у *in vivo* двухфотонной микроскопии имеются значительные ограничения, такие как необходимость фиксации экспериментального животного и ограничения в визуализации глубоких структур мозга. Проблема фиксации была преодолена после создания двухфотонных миниатюрных микроскопов [45–48]. Несмотря на преимущества таких микроскопов, их широкое использование в современных исследованиях в настоящее время ограничено из-за сложностей, связанных с их внедрением и стоимостью [49]. Тем не менее развитие генетически-кодируемых кальциевых индикаторов [50] и КМОП-сенсоров в портативных устройствах привело к развитию миниатюрной однофотонной микроскопии, которая позволила проводить исследования на свободно перемещающихся лабораторных животных [51]. В результате появились однофотонные миниатюрные флуоресцентные микроскопы (минископы), которые стали перспективным инструментом для визуализации нейронной активности *in vivo* благодаря своим компактными размерам,

хорошему разрешению, возможности визуализации глубоких структур головного мозга, например, гиппокампа за счёт имплантации GRIN-линз [52–57].

Следует отметить, что в настоящее время объединение электрофизиологической регистрации и однофотонной миниатюрной микроскопии остается нерешенной проблемой, однако было предпринято несколько попыток для ее преодоления. На текущий момент представлен проект (Ephys miniscope, E-Scope) и научное исследование [1], в которых были предложены возможные варианты объединения однофотонной визуализации кальция *in vivo* и электрофизиологической регистрации.

Проект E-Scope (<http://miniscope.org/neuronex/ephys-miniscope/>) основан на модификации однофотонного миниатюрного микроскопа, которая заключается в формировании направляющих на корпусе минископа для размещения в них тетродов. Такой подход позволяет регистрировать нейронную активность с помощью тетродов путем их размещения под или около градиентной линзы и осуществлять одновременную визуализацию кальция [56]. Несомненным преимуществом данного подхода является возможность регистрации большого количества каналов (16, 32, 64 и 128 каналов), однако существенным недостатком является необходимость хронической фиксации минископа вместе с массивом тетродов. Кроме того, недостатками также являются дополнительное повреждение тканей мозга при имплантации тетродов и увеличение габаритов и массы минископа, что может негативно сказаться на поведении экспериментального животного.

В исследовании Wu с соавт. [1] использовался другой подход, который заключался в размещении прозрачного микроэлектрода на нижнем торце градиентной (GRIN) линзы. При таком подходе не требуется хронически фиксировать минископ вместе с микроэлектродом. Также не происходит значительного увеличения габаритов, массы миниатюрного микроскопа и дополнительного повреждения тканей мозга. Разработанный 4-канальный прозрачный микроэлектрод позволил одновременно записывать электрофизиологические данные и визуализировать кальциевую активность у свободно перемещающейся мыши. Тем не менее существенным недостатком рассмотренного подхода является ограничение в количестве регистрируемых каналов, так как контакты микроэлектрода, расположенные на нижней поверхности GRIN-линзы, частично закрывают область визуализации.

В данном исследовании предлагается альтернативный метод, заключающийся в объединении гибкого микроэлектрода с медными токопроводящими дорожками и позолоченными регистрирующими контактами на полиимидной подложке с боковой стороной градиентной линзы для одновременной однофотонной кальциевой визуализации и электрофизиологической регистрации *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лабораторные мыши

Для проведения данного исследования была создана колония мышей дикого типа из линии B6SJL (номер стока #100012), поставляемых Лабораторией Джексона (Бар Харбор, Мэн, США). Животные размещались в условиях вивария, в клетках по четыре – пять особей, с обеспечением регулируемого светового цикла день/ночь продолжительностью 12/12 ч и постоянным доступом к корму и воде.

Микроэлектрод

Для проведения исследования в программе Altium Designer (Altium, Сан-Диего, Калифорния, США) был разработан 12-канальный (6 регистрирующих контактов на каждой стороне) полиимидный микроэлектрод (рис. 1), а также переходной шлейф для подключения микроэлектрода к беспроводному электрофизиологическому модулю [58] (рис. 2).

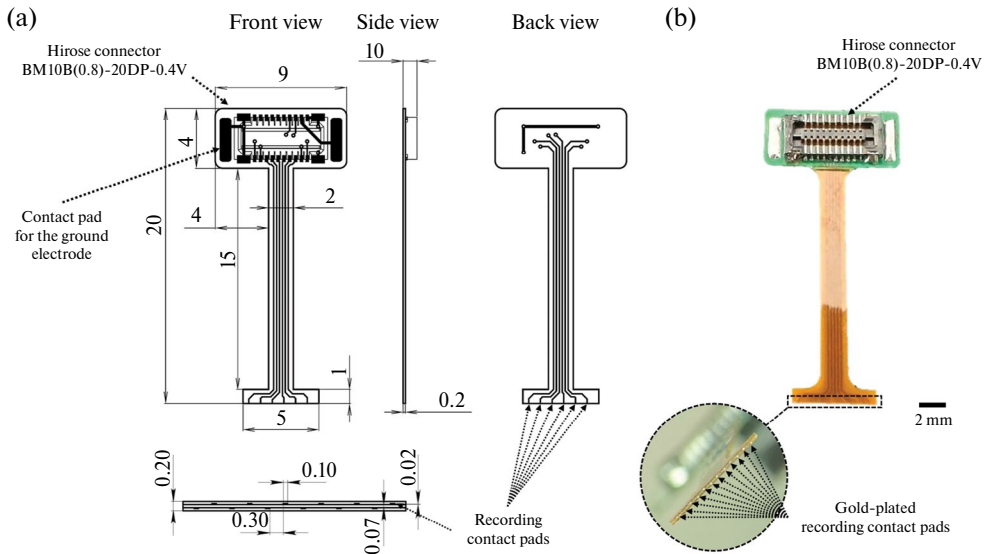


Рис. 1. 12-контактный полиимидный микроэлектрод, разработанный для объединения с градиентной линзой минискапа: (а) – Схема; (б) – Фотография микроэлектрода.

Производство микроэлектрода и переходного шлейфа осуществлялось в компании ООО «Резонит» (Москва, Россия), специализирующейся на производстве и сборке печатных плат.

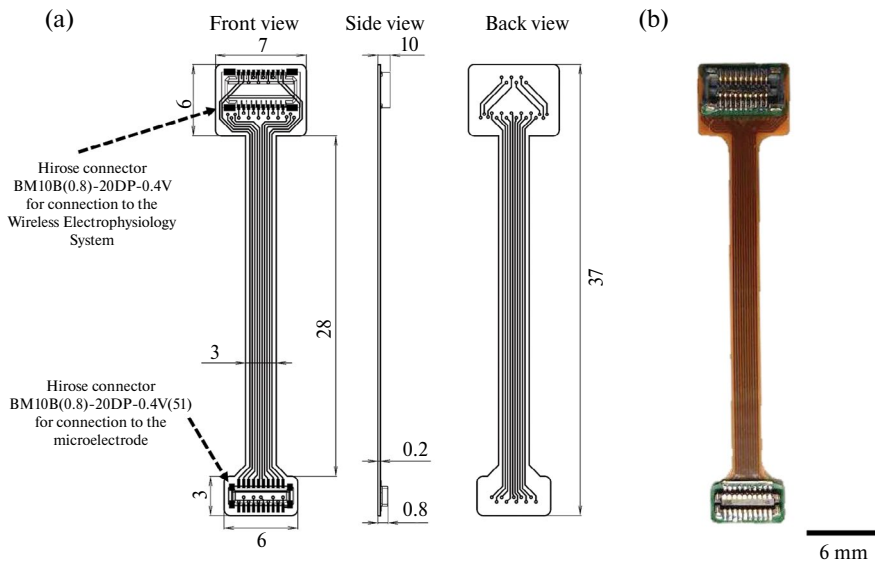


Рис. 2. Переходной шлейф для подключения микроэлектрода к беспроводному электрофизиологическому комплексу: (а) – Схема; (б) – Фотография переходного шлейфа.

Микроэлектрод и переходной шлейф изготавливались из полиимидной основы, ламинированной медной фольгой с обеих сторон (рис. 3а). На первом этапе на заготовку наносился фоточувствительный материал (фоторезист) в условиях чистой комнаты с желтым освещением, чтобы исключить воздействие ультрафиолетового света (рис. 3б). Далее проводилось экспонирование фоторезиста (рис. 3с) с использованием позитивного фотошаблона, соответствующего схеме микроэлектрода или переходного шлейфа. После удаления фотошаблона изображение проявлялось на фоторезисте, где незасвеченные участки растворялись, а засвеченные участки оставались на плате, так как полимеризовались и теряли способность к растворению (рис. 3д). Эти участки были необходимы для избирательного гальванического осаждения меди (рис. 3е). Затем для защиты осажденных участков наносился металлорезист, имеющий более низкую скорость травления по сравнению с медью (рис. 3ф). После удаления фоторезиста проводилось травление меди, во время которого незащищенная медь растворялась, оставляя рисунок токопроводящих дорожек (рис. 3г). После травления удалялся металлорезист (рис. 3h) и наносился покровный слой полиимида с предварительно сформированными отверстиями, соответствующими местоположению контактов (рис. 3i). На заключительной стадии открытые участки меди покрывались золотом для завершения процесса изготовления микроэлектрода (рис. 3j).

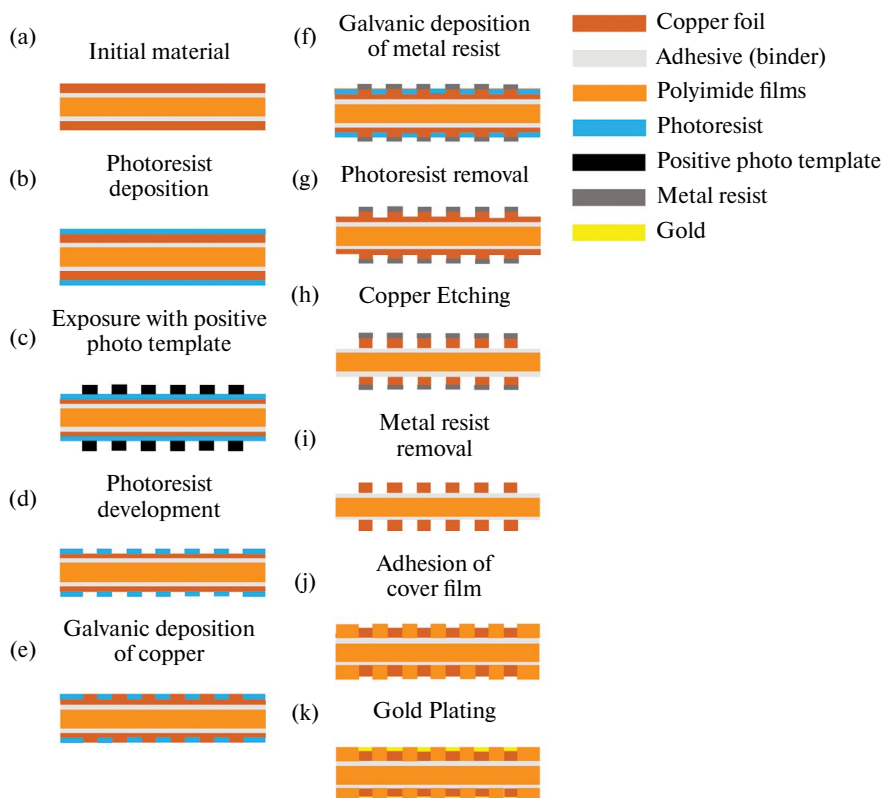


Рис. 3. Процесс производства микроэлектрода и переходного шлейфа в поперечном сечении: (а) – Исходный материал; (б) – нанесение фоторезиста; (с) – экспонирование фоторезиста; (д) – проявление фоторезиста; (е) – гальваническое осаждение меди; (ф) – нанесение металлорезиста; (г) – удаление фоторезиста; (h) – травление меди; (i) – удаление металлорезиста; (j) – нанесение покровного слоя полиимида; (k) – нанесение слоя золота.

На каждой стороне микроэлектрода было сформировано по 6 токопроводящих каналов, образующих в сумме 12 регистрирующих контактов. Эти контакты располагались в шахматном порядке на торце нижней части микроэлектрода, размеры которой составляли 5×1 мм (рис. 1а). Толщина микроэлектрода составляла 0.2 мм. Размеры регистрирующих контактов составляли 0.1×0.02 мм, а межэлектродное расстояние – 0.3 мм. Общая длина микроэлектрода равнялась 20 мм, длина полиимидного шлейфа – 15 мм, а его ширина – 2 мм.

Для подключения к беспроводному электрофизиологическому модулю на микроэлектроде использовался разъем Hirose BM10B(0.8)-20DP-0.4V (Hirose Electric, Канагава, Япония). После изготовления микроэлектрода регистрирующие контакты покрывались слоем золота толщиной 5 мкм. Данный слой формировался методом электроосаждения из раствора золота с концентрацией 0.8 г/л при плотности тока 15 мА/мм² и температуре 25 °С, используя лабораторный источник питания (АКИП, Ижевск, Россия). Оценка импеданса микроэлектрода осуществлялась в 0.1 М фосфатно-солевом буфере. Измерение импеданса проводилось с помощью RLC метра (АММ-3035, АКТАКОМ, Москва, Россия). В процессе измерений использовались переменные синусоидальные сигналы с амплитудой напряжения 5 мВ и частотами от 0.1 до 1000 Гц. В указанном диапазоне частот значения импеданса колебались от 6.28 до 0.14 МΩ.

Финальная форма микроэлектрода формировалась путем его расположения вокруг градиентной линзы диаметром 1.8 мм так, чтобы торцы линзы и микроэлектрода были выровнены. Для фиксации этой конструкции использовалось металлическое кольцо, изготовленное из стальной трубки диаметром 2 мм, разрезанной продольно с одной стороны (рис. 4а). Конструкция формовалась в течение 2 мин при температуре 300 °С. Затем микроэлектрод крепился к градиентной линзе с использованием гелеобразного цианоакрилатного клея общего назначения Loctite 454 (Henkel, Дюссельдорф, Германия). Шлейф микроэлектрода отгибался на 90 градусов относительно GRIN-линзы (рис. 4б), при этом расстояние от верхнего торца линзы до места изгиба составляло 1.5 мм. Эта операция обеспечивала надежную фиксацию линзы при имплантации в головной мозг лабораторного животного и последующей установке опорной площадки минискапа.

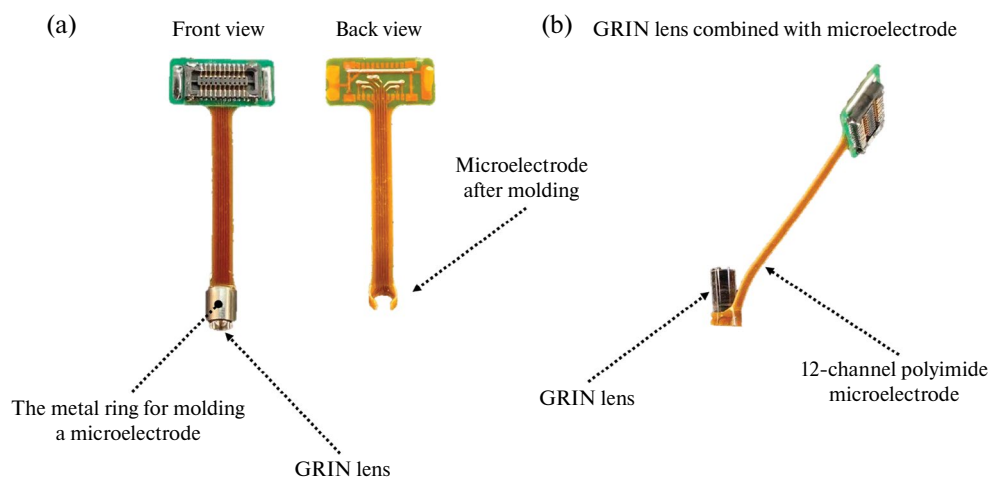


Рис. 4. 12-канальный микроэлектрод. (а) – Формовка 12-канального микроэлектрода вокруг GRIN-линзы диаметром 1.8 мм с использованием металлического кольца для последующей термической обработки; (б) – Комплекс GRIN-линза-микроэлектрод.

Стереотаксические хирургические операции

Все хирургические вмешательства выполнялись под общей анестезией с использованием изофлурана в концентрации 1.5–2%. Начало хирургической процедуры осуществлялось после подтверждения отсутствия болевых рефлексов у животного.

Для прижизненной кальциевой визуализации и одновременной электрофизиологической регистрации в гиппокамп правого полушария 3-месячной мыши дикого типа линии B6SJL вводили 1 мкл аденоассоциированного вируса AAV5.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 с титром 1×10^{13} вирусных частиц на мл. Доставка вируса в гиппокамп осуществлялась со скоростью 100 нл в мин с помощью шприца 75 RN на 5 мкл (#65460–03, Hamilton, Рино, Невада, США) в соответствии со стандартным протоколом [59]. Процедура проводилась с использованием следующих координат стереотаксической установки (68001, RWD Life Science, Шэньчжэнь, Китай): AP –2.1; DV –1.8; ML –2.1.

Через 4 недели после введения вируса производилась имплантация GRIN-линзы диаметром 1.8 мм (#64–519, Edmund Optics, Флорида, США), объединенной с микроэлектродом. Относительно координат имплантации вируса формировались направляющие отверстия и проводилась круговая краниотомия размером 2.1 мм с использованием стоматологического бора. После этого костный фрагмент и твердая мозговая оболочка были акуратно удалены. В случае кровотечения зона имплантации дополнительно промывалась фосфатно-солевым буферным раствором и заполнялась гемостатической губкой (ФНПЦ Белкозин, Россия). На противоположной от места имплантации стороне черепа с помощью стоматологического бора создавалось небольшое отверстие для установки микровинта M1 x 3, который соединялся с серебряной проволокой (#783500, AM-systems, Вашингтон, США). Эта проволока затем подключалась к контакту заземления микроэлектрода. Для удаления слоев коры над гиппокампом использовался стоматологический аспиратор OM-1 (Утес, Россия) и шприц с тупым концом [56]. Во время этой процедуры область отбора периодически заполнялась фосфатно-солевым буфером, процесс продолжался до появления серебристых волокон. Затем комплекс GRIN-линза-микроэлектрод с помощью специального крепления фиксировался в стереотаксической установке и опускался на глубину 1.4 мм ниже верхней части черепа в заранее подготовленную область имплантации. Наружная поверхность GRIN-линзы и микроэлектрода закреплялась на черепе с помощью цианоакрилатного клея Cosmofen CA-500.200 (Weiss Chemie, Хайгер, Германия). После высыхания клея держатель GRIN-линзы удалялся, а костная ткань покрывалась светоотверждаемым стоматологическим цементом ДентЛайт флоу (ВладМиВа, Россия). По завершении операции уровень анестезии изофлураном снижался до 0%, животному подкожно вводилось 0.1 мл дексаметазона «Кортексон Ретард» (SYVA Laboratorios S.A, Леон, Испания) и его переносили в клетку с терморегулирующим электрическим подогревательным ковриком для восстановления.

В начальный послеоперационный период животное получало мягкую пищу, такую как мелкоизмельченная каша. Через три недели после имплантации производилась фиксация опорной площадки (base plate) минискапа на черепе животного с использованием светоотверждаемого стоматологического цемента (ДентЛайт флоу, ВладМиВа, Россия). Минископ подключался к цифро-аналоговому преобразователю (Labmaker, Берлин, Германия) и осуществлялась визуализация с использованием свободно распространяемого программного обеспечения Portable Miniscope Data Acquisition (Pomidaq, 0.5.1, <https://github.com/bothlab/pomidaq>) на персональном компьютере. Опорная площадка крепилась к нижней части минискапа UCLA Miniscope v3 (Labmaker, Берлин, Германия) с помощью магнитов и фиксирующего винта. После совмещения минискапа с имплантированной GRIN-линзой и получения четкого изображения флуоресцирующих нейронов опорная площадка фиксировалась на черепе с помощью цемента.

Визуализация кальция и электрофизиология in vivo

Визуализация кальциевой активности нейронов гиппокампа, экспрессирующих GCaMP6f в области CA1, проводилась через семь недель после стереотаксического введения вирусной конструкции AAV5.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40. Для этого использовался миниатюрный флуоресцентный микроскоп UCLA Miniscope v3 (Labmaker, Берлин, Германия) массой 2.8 г. Флуоресценция нейронов гиппокампа регистрировалась при возбуждении синим светом через имплантированную градиентную линзу. В качестве источника света использовался синий светодиод с длиной волны 470 нм LXML-PB01-0030 (Lumileds, Хаарлеммермер, Нидерланды), установленный в UCLA Miniscope v3. Настройка фокуса изображения флуоресцирующих нейронов осуществлялась с помощью фокусирующего слайдера минископа (рис. 5a). Процесс регистрации флуоресценции нейронов гиппокампа области CA1 с помощью минископа можно описать следующим образом (рис. 5a):

- *Стадия возбуждения:* излучение от синего светодиода проходит через полусферическую линзу N-BK7 (Edmund Optics, Баррингтон, Нью-Джерси, США) для коллимации и фокусировки светового пучка. Этот пучок затем проходит через фильтр возбуждения ET470/40x (Chroma Technology Corp, Беллоуз-Фоллс, Вермонт, США), который пропускает свет с длиной волны 470 ± 20 нм и отражается от дихроического зеркала T495lpxr (Chroma Technology Corp, Беллоуз-Фоллс, Вермонт, США), направляясь в градиентную линзу (#64-519, Edmund Optics, Флорида, США) для фокусировки на нейронах гиппокампа.
- *Регистрация флуоресценции:* флуоресцентное излучение от нейронов проходит обратно через градиентную линзу, отражается от дихроического зеркала и проходит через фильтр эмиссии ET525/50m (Chroma Technology Corp, Беллоуз-Фоллс, Вермонт, США), который пропускает свет с длиной волны 525 ± 25 нм. Свет далее корректируется ахроматической двоянной линзой (увеличение от 6х до 7х) N-BAF10/N-SF10 (Edmund Optics, Баррингтон, Нью-Джерси, США) для уменьшения хроматических aberrаций и фокусируется на КМОП-сенсоре.
- *Преобразование и передача данных:* световой сигнал на КМОП-сенсоре преобразуется в электрические сигналы, которые передаются по гибкому коаксиальному кабелю CW2040-3650 SR (Cooner Wire, Чатсворт, Калифорния, США) в контроллер системы сбора данных DAQ (Labmaker, Берлин, Германия). Информация из системы сбора данных передается на персональный компьютер через USB3.0-кабель по протоколу USB Video Class (UVC).

Регистрация нейронной активности осуществлялась с использованием беспроводной электрофизиологической системы (рис. 5b) массой 0.95 г [58]. Система состояла из носимого беспроводного модуля и программного обеспечения с открытым исходным кодом для управления и регистрации данных. Носимый модуль был построен на базе микропроцессора-приемника-передатчика NRF52805-CAAA-R7 (Nordic Semiconductor, Тронхейм, Норвегия) и 32-канальной микросхемы униполярного входного усилителя RHD2132 (Intan Technologies, Лос-Анджелес, Калифорния, США). Дифференциальный коэффициент усиления, обеспечиваемый микросхемой RHD2132, составлял 192 В/В.

Основные компоненты носимого модуля включали два 20-позиционных розеточных разъема BM10NB(0.8)-20DS-0.4V(51) (Hirose Electric, Канагава, Япония); керамическую антенну 2450AT18A100E (Johanson Technology, Камарилло, Калифорния, США); контроллер заряда литий-ионных и литий-полимерных батарей MCP73812T-420I/OT (Microchip Technology Inc, Чандлер, Аризона, США); стационарный стабилизатор с низким падением напряжения MCP1700-3002E/TO (Microchip Technology Inc, Чанд-

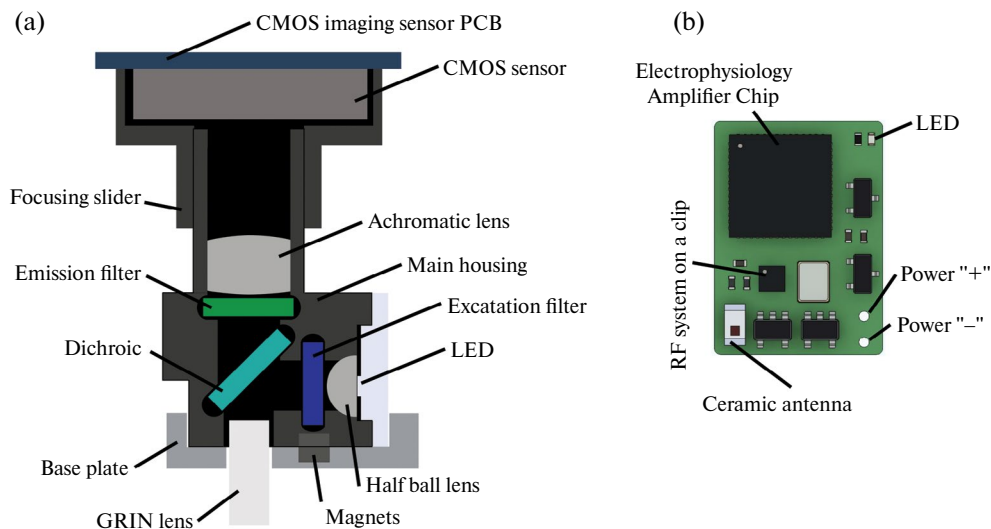


Рис. 5. Схематическое изображение: (a) – Миниатюрного флуоресцентного микроскопа (минископ); (b) – Беспроводного электрофизиологического модуля.

лер, Аризона, США); стабилизатор напряжения TLV70033_SOT23–5 (Texas Instruments, Даллас, Техас, США); датчик Холла KTH1601SL-ST3 (CONNTEK Microelectronics Technology, Цюаньчжоу, Китай); светодиод KPHHS-1005SECK (Kingbright, Шанхай, Китай) и кварцевый резонатор на 32 МГц NX2520SA (NDK, Токио, Япония).

Передача данных проводилась по протоколу Bluetooth Low Energy, что обеспечивало высокую энергоэффективность и достаточную пропускную способность для передачи электрофизиологических данных. Частота дискретизации, поддерживаемая беспроводным модулем, равнялась: 1000 Гц для двух каналов, 500 Гц для четырех каналов, 250 Гц для восьми каналов, 125 Гц для шестнадцати каналов, до 62 Гц для тридцати двух каналов.

Подключение всей системы осуществлялось в соответствии со схемой на рис. 6 и изображением на рис. 7а.

Крепление беспроводного модуля к минископу осуществлялось с помощью электроизоляционной двусторонней клейкой ленты. Для обеспечения электропитания беспроводного модуля электрофизиологической системы использовалось напряжение 5V от конденсатора на плате минископа вместо подключения внешнего аккумулятора (рис. 7б). Такое решение было принято с целью уменьшения общей массы и габаритов конструкции.

Оптическая (визуализация Ca^{2+}) и электрофизиологическая регистрация нейронной активности проводилась в камере Фарадея для экранирования внутреннего пространства от внешних электростатических и электромагнитных полей.

Запись данных прижизненной кальциевой визуализации проводилась с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом Pomidaq v0.5.1 (<https://github.com/bothlab/pomidaq>). Видеоданные регистрировались со скоростью 20 кадров в секунду. Уровень усиления флуоресцентного сигнала (Gain) на КМОП-сенсоре минископа был установлен на среднее значение (Medium). Интенсивность светодиода LXML-PB01–0030 (Lumileds, Хаарлеммермер, Нидерланды) регулировалась в диапазоне от 8 до 16% максимальной мощности (35 люмен). Все полученные данные сохранялись в формате AVI с разрешением 752 на 480 пикселей.

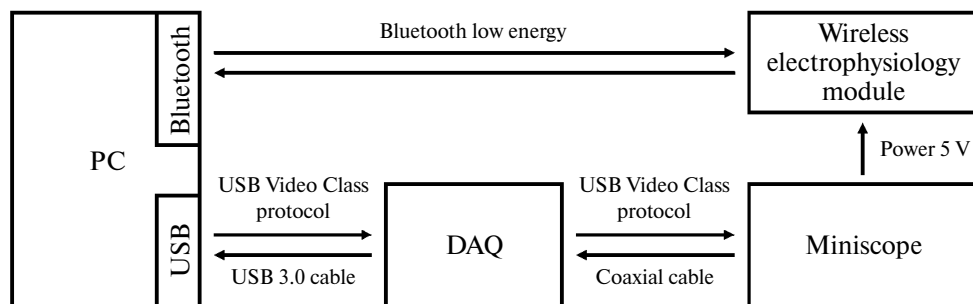


Рис. 6. Принципиальная схема подключения системы одновременной прижизненной визуализации кальция и электрофизиологической регистрации. Миниатюрный флуоресцентный микроскоп (минископ) соединён с системой сбора данных (DAQ) при помощи коаксиального кабеля. В свою очередь DAQ подключен к персональному компьютеру через кабель USB3.0, который обеспечивает передачу данных, питание и управление минископом. Питание от USB-порта персонального компьютера передаётся на DAQ, а затем по коаксиальному кабелю поступает на минископ. Таким образом, напряжение 5 В формируется на конденсаторе печатной платы (PCB) минископа и далее подаётся на беспроводной электрофизиологический модуль. Передача данных с модуля на персональный компьютер осуществляется по протоколу Bluetooth Low Energy.

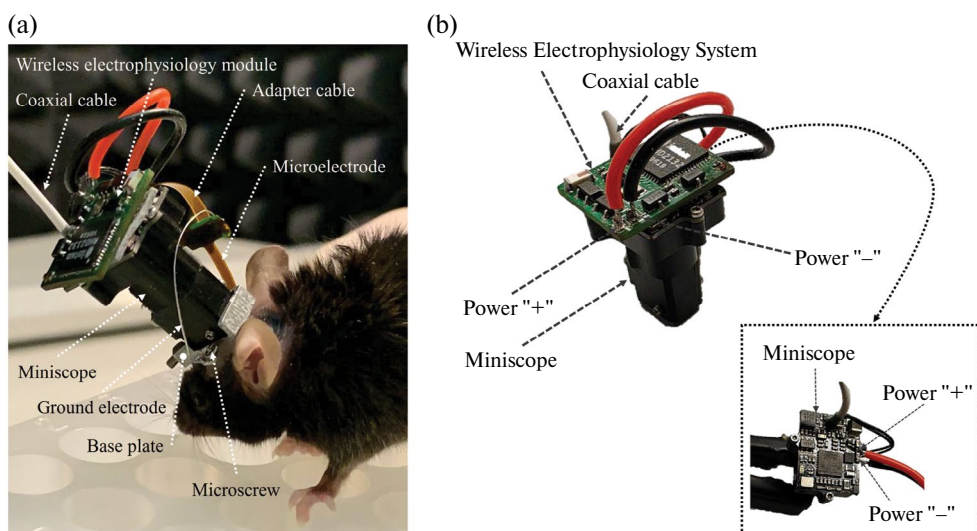


Рис. 7. Компоненты системы для одновременной прижизненной кальциевой визуализации и электрофизиологической регистрации: (a) – Внешний вид всей системы; (b) – Подключение беспроводного электрофизиологического модуля к минископу. В рамке, выделенной пунктирной линией, показано подключение питания беспроводного электрофизиологического модуля к конденсатору на плате минископа.

Запись электрофизиологических данных осуществлялась с использованием программного обеспечения с открытым исходным кодом `ble_mouse.py` (<https://github.com/Imn-projects/WES-2.0/tree/main/software>), разработанного для беспроводной электрофизиологической системы. Нейронная активность регистрировалась в двухканальном

режиме без фильтрации помех с частотой дискретизации 1000 Гц. Данные сохранялись в формате csv – текстовом формате данных, используемом для хранения табличной информации.

Синхронизация кальциевой и электрофизиологической регистрации достигалась путем одновременного запуска программ Pomidaq v0.5.1 и ble_mouse.py с помощью свободно распространяемого программного обеспечения AutoHotkey v2.0.

Обработка данных

Обработка и визуализация данных осуществлялась с использованием дистрибутива языков программирования Python и R для научных вычислений – Anaconda версии 2024.02–1 (<https://www.anaconda.com/download>).

Обработка данных минискапа производилась в среде Jupyter Notebook с применением пакета с открытым исходным кодом Minian (<https://github.com/denisecailab/minian>) для анализа и визуализации данных однофотонной миниатюрной флуоресцентной микроскопии [60]. Используемые параметры были установлены по умолчанию. Установка пакета Minian проводилась с использованием пакетного менеджера Mamba (<https://mamba.readthedocs.io/en/latest/installation/mamba-installation.html>). Результатом обработки исходных данных с использованием пакета Minian стало определение спонтанной Ca^{2+} -активности нейронов, которая выражалась в виде относительного изменения интенсивности свечения ($\Delta F/F$). Количественный анализ данных осуществлялся с использованием пакета с открытым исходным кодом NeuroActivityToolkit (<https://github.com/spbstu-applied-math/NeuroActivityToolkit>) [61].

Электрофизиологические данные анализировались также в Jupyter Notebook. Загрузка данных из CSV-файлов производилась функцией `genfromtxt` библиотеки NumPy. Выравнивание базовой линии записей нейронной активности осуществлялось с помощью медианного фильтра `medfilt` из той же библиотеки. Для устранения электрического шума на частоте 50 Гц использовался фильтр Баттерворта 8-го порядка, реализованный через функции `signal.butter` и `signal.filtfilt` библиотеки SciPy. Амплитуда локальных полевых потенциалов определялась с помощью функции `signal.find_peaks`, при этом пороговое значение для поиска пиков составляло 0.1 мВ. Визуализация данных, включая диаграммы распределения электрического импеданса и активности Ca^{2+} , проводилась с использованием библиотеки Matplotlib.

Электрический импеданс Z определялся как сумма активного сопротивления R и реактивного сопротивления X . В контексте регистрации биопотенциалов, таких как нейронная активность, реактивное сопротивление считалось емкостным и обозначалось как X_C . Реактивное емкостное сопротивление X_C вычислялось по следующей формуле:

$$X_C = \frac{1}{2\pi f C},$$

где f – частота, C – емкость.

Значение импеданса определялось по следующей формуле:

$$Z = \sqrt{R^2 + X_C^2},$$

где R – активное сопротивление, X_C – емкостное реактивное сопротивление.

Соотношение сигнал-шум (SNR) рассчитывалось по формуле:

$$\text{SNR} = 20 \log_{10} \left(\frac{A_{\text{signal}}}{A_{\text{noise}}} \right),$$

где A_{signal} – амплитуда ЛПП, а A_{noise} – амплитуда шума.

Среднее количество «активаций нейронов» за единицу времени (Burst rate) рассчитывалось следующим образом:

$$\text{Burst rate} = \frac{\sum_{x \in A} \text{active}(x)}{t},$$

где A – множество нейронов, $\text{active}(x)$ равно 1, если нейрон активен, и 0 в противном случае, t – временной интервал.

Частота сетевых спайков (Network spike rate) определялась как процент активных нейронов за заданный временной интервал и рассчитывалась по формуле:

$$\text{Network spike rate} = \frac{\sum_{x \in A} \text{active}(x)}{\text{size}(A)},$$

где A – множество нейронов, $\text{active}(x)$ равно 1, если нейрон активен, и 0 в противном случае, $\text{size}(A)$ – количество нейронов в множестве.

Пиковое значение сетевых спайков (Network spike peak), которое представляет собой максимальное количество одновременно активных клеток в заданный временной промежуток, рассчитывалось по формуле:

$$\text{Network spike peak} = \max_{i=1}^t \left(\frac{\sum_{x \in A} \text{active}(x_i)}{\text{size}(A)} \right),$$

где $\text{size}(A)$ – количество нейронов в множестве, $\text{active}(x_i)$ равно 1, если нейрон активен в момент i , и 0 в противном случае, t – временной интервал.

Коэффициент корреляции Пирсона r между двумя переменными X и Y вычислялся по формуле:

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 \sum (Y_i - \bar{Y})^2}},$$

где: X_i и Y_i – значения переменных X и Y в i -том наблюдении, и – средние значения переменных X и Y . Эта формула выражает стандартизированное ковариационное отношение между двумя переменными и показывает, насколько одна переменная изменяется в зависимости от другой. Значение коэффициента r изменяется в диапазоне от -1 до 1 , где 1 указывает на полную положительную корреляцию, -1 – на полную отрицательную корреляцию, а 0 означает отсутствие линейной взаимосвязи.

Статистический анализ

Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Измерения проводились на одной лабораторной мыши дикого типа (B6SJL). При измерении импеданса было использовано 6 микроэлектродов, измерения проводились для всех регистрирующих контактов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Импеданс микроэлектродов

Для данного исследования разработан 12-канальный гибкий полиимидный микроэлектрод проникающего типа, который имплантируется непосредственно в ткань мозга и требует хирургического вмешательства [11]. Данный тип микроэлектродов предназначен для регистрации ПД и ЛПП [62]. Конструкция разработанного микроэлектрода ориентирована на регистрацию ЛПП.

Диапазон частот локальных полевых потенциалов популяций нейронов составляет от 1 Гц до 300 Гц, в то время как для отдельных нейронов диапазон увеличивается от 300 до 5 кГц [63]. Частоты локальных полевых потенциалов нейронов гиппокампа чаще всего характеризуются тета-ритмом (7–9 Гц) [64], острыми волнообразными колебаниями (150–250 Гц) [65] и гамма-ритмом (60–120 Гц) [66, 67]. Таким образом, регистрируемые в гиппокампе ЛПП находятся в диапазоне от 7 до 250 Гц.

Рекомендуется, чтобы значение импеданса не превышало 2–5 МΩ, поскольку высокие значения импеданса могут привести к ослаблению сигнала в зависимости от конструкции микроэлектрода и системы усиления регистрируемого сигнала [15].

Анализ импеданса разработанного микроэлектрода показал следующие значения: при частоте 7 Гц среднее значение импеданса составило 1.95 ± 0.12 МΩ, при частоте 50 Гц 0.42 ± 0.01 МΩ, при частоте 100 Гц 0.28 ± 0.03 МΩ, при частоте 200 Гц 0.27 ± 0.05 МΩ, при частоте 300 Гц 0.2 ± 0.01 МΩ (рис. 8).

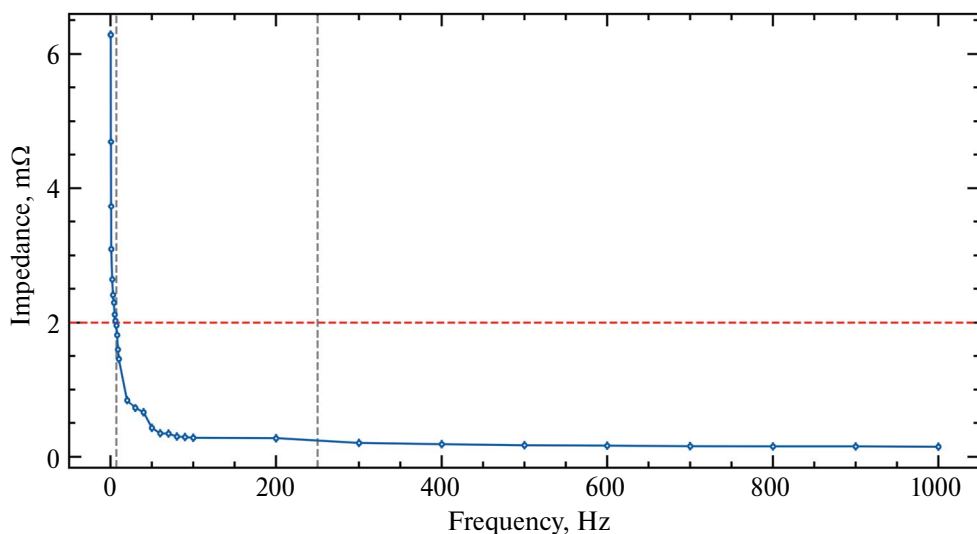


Рис. 8. Распределение импеданса регистрирующих контактов разработанного 12-канального микроэлектрода. При измерении импеданса применялись переменные синусоидальные сигналы с амплитудой напряжения 5 мВ и частотами от 0.1 до 1000 Гц. Пунктирными темно-серыми линиями отмечен диапазон частот от 7 до 250 Гц. Сплошной линией красного цвета отмечен уровень импеданса равный 2 МΩ.

С уменьшением частоты f происходит увеличение емкостного сопротивления X_C , поскольку X_C обратно пропорционально f . В результате это приводит к увеличению общего импеданса Z , что подтверждается экспериментальными данными. Такая зависимость имеет важное значение при выборе параметров для анализа нейронной активности. В диапазоне частот сигнала от 7 до 250 Гц значение импеданса разработанного микроэлектрода составило менее 2 МΩ.

Кальциевая визуализация и электрофизиологическая регистрация in vivo

Через несколько дней после фиксации опорной площадки на черепе лабораторной мыши в камере Фарадея проводилась визуализация Ca^{2+} и электрофизиологическая регистрация активности нейронов гиппокампа. Минископ с подключенным беспроводным электрофизиологическим модулем крепился к опорной площадке с помощью маг-

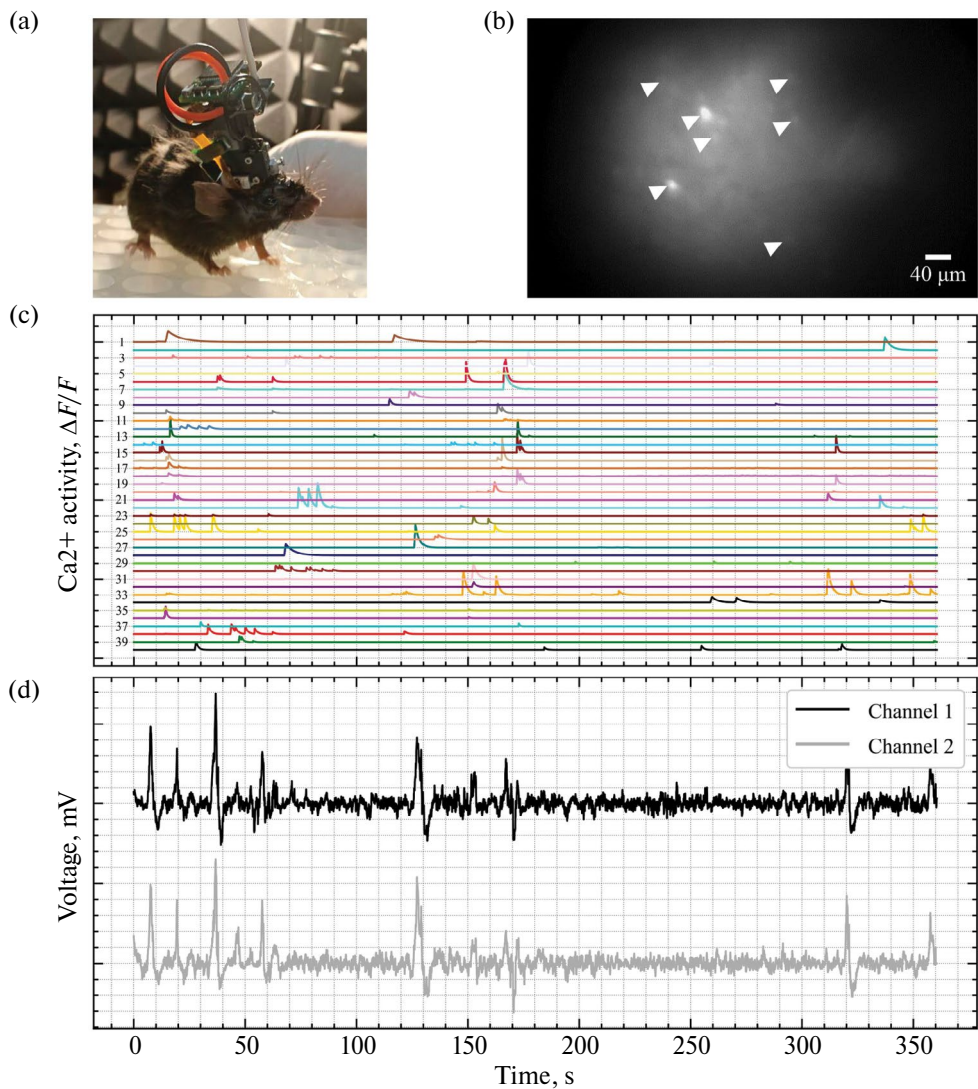


Рис. 9. Одновременная визуализация Ca^{2+} и регистрация локальных полевых потенциалов *in vivo*: (a) – Фотография системы для одновременной прижизненной кальциевой визуализации и электрофизиологической регистрации у лабораторной мыши во время проведения эксперимента; (b) – Изображение флуоресцирующих нейронов (отмечены белыми треугольниками), полученное с помощью однофотонного миниатюрного флуоресцентного микроскопа; (c) – Пример нормированной спонтанной Ca^{2+} -активности для 40 нейронов области CA1 гиппокампа, идентифицированных программой MiniAn; (d) – Пример электрофизиологической записи, полученной с помощью беспроводного электрофизиологического комплекса во время кальциевой визуализации.

нитов и фиксирующего винта (рис. 9а). Микроэлектрод подключался к беспроводному модулю через переходной шлейф. Результаты одновременной прижизненной визуализации Ca^{2+} и электрофизиологической регистрации во время свободного перемещения лабораторной мыши представлены на рис. 9. Пример исходных данных, полученных с помощью минискапа, представлен на рис. 9б.

На рис. 9с представлена спонтанная Ca^{2+} -активность нейронов гиппокампа области CA1 в виде относительного изменения интенсивности свечения ($\Delta F/F$). Данные были получены после обработки исходных данных (рис. 9б) с использованием программного обеспечения Minian. Зарегистрированные ЛПП показаны на рис. 9д. Полученные результаты подтверждают, что разработанный микроэлектрод в сочетании с GRIN-линзой позволяет проводить одновременную визуализацию Ca^{2+} и электрофизиологическую регистрацию.

Анализ электрофизиологических данных показал, что среднее значение амплитуды ЛПП составило 0.18 ± 0.01 мВ для первого канала и 0.15 ± 0.01 мВ для второго. Для сравнения: средняя амплитуда шума составила 0.025 ± 0.001 мВ для обоих каналов. Максимальные значения амплитуды ЛПП достигли 0.24 мВ и 0.30 мВ соответственно.

Полученные значения SNR составили 16.94 dB и 15.22 dB для первого и второго каналов соответственно. Мощность сигнала составила 0.034 ± 0.005 Вт для первого канала и 0.025 ± 0.005 Вт для второго. Среднеквадратичное значение для первого и второго каналов составило 0.18 мВ и 0.16 мВ соответственно.

Как было отмечено ранее, первичная обработка данных кальциевой визуализации проводилась с использованием программного обеспечения Minian. Получение средних значений параметров, таких как частота всплесков активности (Burst rate), частота сетевых спайков (Network spike rate) и пиковое значение сетевых спайков (Network spike peak) осуществлялось посредством программного обеспечения NeuroActivityToolkit.

Анализ данных кальциевой визуализации показал, что средняя частота всплесков активности (Burst rate) составляет 0.96 ± 0.15 активных клеток в секунду. Средняя частота сетевых спайков (Network spike rate) достигла значения $3.91 \pm 0.21\%$. Среднее пиковое значение сетевых спайков (Network spike peak) составило $3.63 \pm 0.18\%$.

Далее мы рассчитали коэффициент корреляции Пирсона для оценки степени линейной зависимости между кальциевыми сигналами и регистрируемыми ЛПП. Расчет коэффициента корреляции Пирсона является широко используемым методом статистического анализа [68, 69]. Коэффициенты корреляции вычислялись для каждой пары данных, что позволило оценить, насколько тесно изменения одного сигнала связаны с изменениями в другом. Коэффициенты корреляции Пирсона варьировались от незначительных до умеренных, что указывает на слабую и умеренную линейную зависимость между кальциевыми сигналами и ЛПП. Например, для кальциевого сигнала под номером 1 корреляция с ЛПП первого и второго каналов составила -0.060 и -0.082 соответственно, что указывает на слабую линейную связь. Для кальциевого сигнала под номером 13 корреляция с ЛПП первого и второго каналов составила 0.288 и 0.323 соответственно, что указывает на умеренную положительную корреляцию.

Результаты исследования иллюстрируют эффективность использования GRIN-линзы в сочетании с микроэлектродами для одновременной *in vivo* визуализации кальциевой активности и электрофизиологической регистрации. Полученные данные подтверждают, что разработанный метод обеспечивает расширенную информацию о нейронной активности во время свободного перемещения лабораторной мыши.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе представлен подход, который позволяет одновременно осуществлять наблюдение за кальциевой активностью и регистрацию ЛПП в гиппокампе свободно передвигающихся мышей. Разработанная система включает микроэлектрод, ко-

торый размещён вокруг градиентной линзы таким образом, что не оказывает влияния на её оптические характеристики. Это обеспечивает отсутствие фотоэлектрических артефактов и искажений при визуализации Ca^{2+} .

Размеры регистрирующих контактов разработанного микроэлектрода составили 100 на 20 мкм с межэлектродным расстоянием 300 мкм. Данная конфигурация пригодна для регистрации ЛПП. Микроэлектроды с большими по площади регистрирующими контактами могут одновременно регистрировать активность большего количества нейронов [70, 71], однако они дают эффект усреднения, который снижает пиковую амплитуду сигнала [63, 72]. Также стоит отметить, что большей площади регистрации можно добиться за счет использования более высокой плотности регистрирующих контактов. Если учитывать, что средний размер сомы нейрона гиппокампа области CA1 составляет 15–20 мкм [73], текущая конфигурация микроэлектрода не подходит для регистрации спайковой активности отдельных нейронов. Следовательно, в дальнейшем представляется необходимым увеличение количества регистрирующих контактов, а также уменьшение их размеров и межэлектродного расстояния для улучшения точности и разрешающей способности микроэлектрода. Еще одним улучшением разработанного микроэлектрода может стать замена материала подложки с полиимида на парилена С [74]. Переход на использование парилена С обусловлен его меньшей гигроскопичностью и повышенной устойчивостью к воздействию физиологических сред. Благодаря возможности напыления этого материала создание покрытий из тонких пленок позволит существенно снизить толщину микроэлектрода, что улучшит его функциональные характеристики и уменьшит инвазивность при использовании.

Как было отмечено ранее, импеданс микроэлектрода определяется рядом факторов, включая материал токопроводящих дорожек, покрытие электрода, его геометрию, частоту измерений, среду использования, а также возраст и состояние электрода [11]. Высокий импеданс может негативно влиять на качество записываемых сигналов, увеличивая уровень теплового шума и ухудшая соотношение сигнал-шум [75]. Это особенно важно при регистрации слабых биопотенциалов, таких как нейронная активность [76]. Высокий импеданс также может снижать амплитуду полезного сигнала и повышать чувствительность к электрическим помехам, вызывая фазовые искажения на высоких частотах, что усложняет интерпретацию данных [71, 77]. Разработанный полиимидный микроэлектрод характеризуется низким импедансом, обеспечивающим регистрацию ЛПП без значительного затухания в диапазоне от 7 до 250 Гц [11, 78]. При увеличении частоты сигнала наблюдалось снижение импеданса, которое составило $1.95 \pm 0.12 \text{ М}\Omega$ при 7 Гц, $0.42 \pm 0.01 \text{ М}\Omega$ при 50 Гц, $0.28 \pm 0.03 \text{ М}\Omega$ при 100 Гц, $0.27 \pm 0.05 \text{ М}\Omega$ при 200 Гц и $0.2 \pm 0.01 \text{ М}\Omega$ при 300 Гц. Полученная зависимость объясняется тем, что емкостное реактивное сопротивление X_c обратно пропорционально частоте сигнала, что приводит к уменьшению общего импеданса Z . Снижение импеданса разработанного микроэлектрода было достигнуто благодаря геометрии его регистрирующих контактов ($100 \times 20 \text{ мкм}$), что увеличило площадь соединения с тканью, а также с помощью покрытия золотом, которое обладает высокой электропроводностью ($4.11 \times 10^7 \text{ См/м}$) и химической стабильностью [11].

При дальнейшем усовершенствовании конструкции микроэлектрода, а именно увеличении количества регистрирующих контактов за счет уменьшения их размеров и межэлектродного расстояния импеданс будет возрастать. Для решения этой проблемы необходимым будет применение дополнительных покрытий, таких как PEDOT или чернение платиной (Pt black), которые увеличивают шероховатость и эффективную площадь регистрирующих контактов [79]. Кроме того, дальнейшее снижение импеданса позволит проводить более длительные хронические эксперименты, поскольку с течением времени импеданс микроэлектрода увеличивается вследствие электрохимического износа и инкапсуляции биологическими тканями [80, 81].

Основная цель данной работы заключалась в демонстрации возможностей реализации прижизненной визуализации Ca^{2+} и электрофизиологической регистрации у свободно передвигающихся животных с использованием решений с открытым исходным кодом. Мы продемонстрировали, что предложенная система позволяет одновременно визуализировать Ca^{2+} -активность и регистрировать локальные полевые потенциалы. Хотя в настоящей версии статьи основной акцент сделан на описании конструкции микроэлектрода и его технических аспектах, представлен также краткий анализ корреляции кальциевых и полевых сигналов. Однако для проведения полноценного анализа необходимо преодолеть ряд ограничений, в частности, увеличить количество регистрируемых каналов и частоту дискретизации до 1000 Гц. В будущем мы планируем улучшить прошивку беспроводного электрофизиологического модуля для повышения его производительности.

Рассматривая сравнение визуализации Ca^{2+} и электрофизиологической регистрации, следует отметить, что визуализация Ca^{2+} позволяет изучать нейронную динамику сотен клеток и целенаправленно анализировать активность специфических типов нейронов [82, 83]. Также с использованием Ca^{2+} -визуализации можно выявить пространственные зависимости между нейронами со схожими паттернами активности [84]. С помощью визуализации Ca^{2+} можно отслеживать активность отдельных нейронов в течение длительного времени для исследования процессов обучения и формирования памяти [85, 86]. Однако этот метод не регистрирует активность напрямую, а фиксирует изменения концентрации внутриклеточного кальция, что косвенно отражает нейронную активность [2, 87]. При этом Ca^{2+} -визуализация характеризуется сравнительно низким соотношением сигнал/шум и ограниченным динамическим диапазоном [88]. В дополнение, в процессе анализа поведения животных наблюдаются значительные колебания частоты спайков, которые могут различаться на порядки как в разные поведенческие периоды, так и среди нейронов одного типа [89–91]. Кроме того, корреляция между спайками и кальций-зависимой флуоресценцией может различаться в зависимости от типа нейронов и даже среди отдельных нейронов одного типа [92, 93].

С другой стороны, электрофизиологические записи обеспечивают прямую регистрацию нейронной активности с высоким соотношением сигнал/шум, временной точностью и динамическим диапазоном [20]. Однако этот метод обладает ограничениями, такими как менее точное выявление нейронов с низкой активностью [94] и регистрация небольшого подмножества относительно активных нейронов [20]. Кроме того, возможность отслеживания одной и той же популяции нейронов во времени остаётся сложной задачей из-за зарастания и подвижности микроэлектрода [95, 96]. В отличие от визуализации Ca^{2+} процесс разделения спайков, связанных с отдельными нейронами, может приводить к появлению артефактов, таких как слияние спайков от разных нейронов [94]. Эти особенности делают электрофизиологические и оптические методы взаимодополняющими в комплексных нейробиологических исследованиях. В ряде исследований предпринимались попытки сопоставить визуализацию кальция с электрофизиологической регистрацией, и в целом было выявлено качественное согласие между данными методами, хотя оценки основывались на статических и относительно грубых измерениях [82, 92]. Однако в другом исследовании, в котором сравнивалась активность, зарегистрированная с помощью электрофизиологических и оптических методов от сопоставимых популяций нейронов во время выполнения одной и той же поведенческой задачи, было обнаружено, что различные методы регистрации могут привести к расхождению в результатах [94]. В результате наших исследований была выявлена слабая или умеренная корреляция между Ca^{2+} -сигналами и ЛПП. Различия в уровнях корреляции между Ca^{2+} -сигналами могут отражать разнообразие функциональной динамики нейронных ансамблей, участвующих в генерации этих сигналов. В нашем случае наиболее вероятно, что такие расхождения связаны с особенностями

расположения и удалённостью регистрирующих контактов микроэлектрода, интегрированного с градиентной линзой. Это предположение подчёркивает важность учета геометрических и пространственных аспектов при интерпретации полученных данных. Сопоставление и поиск корреляции между кальциевыми и полевыми сигналами представляет собой сложную и неоднозначную задачу, требующую проведения отдельных масштабных исследований.

В данной работе применялась беспроводная электрофизиологическая система для снижения ограничений передвижения животных, вызванных скручиванием кабелей. Этот проект является переходным этапом к полностью беспроводной системе. В дальнейшем планируется интеграция с беспроводными минископами [97], что позволит исключить проводные соединения и минимизировать риски, связанные с ограничением движений животных во время экспериментов. Кроме того, возможно использование двухфотонных миниатюрных микроскопов, которые позволяют визуализировать активность не только в соме, но и в дендритах и шипиках нейронов у свободно передвигающихся животных [98].

Несмотря на работоспособность предложенного подхода, его использование ограничено проблемами синхронизации между минископом и электрофизиологической системой в процессе регистрации. Данное ограничение связано с аппаратными особенностями беспроводного модуля [58], что предполагает необходимость их преодоления в будущих версиях беспроводной электрофизиологической системы. К тому же, одним из недостатков методики является ручная формовка микроэлектрода вокруг GRIN-линзы, что может влиять на точность позиционирования. Решение этой проблемы предполагается с использованием металлической пресс-формы, где градиентная линза и микроэлектрод будут фиксироваться в зажиме с продольным разрезом цилиндра и упором для выравнивания. Процесс нагрева пресс-формы позволит достичь необходимой формы микроэлектрода для его дальнейшего объединения с GRIN-линзой.

Совместная прижизненная визуализация Ca^{2+} и электрофизиологическая регистрация являются перспективными методами в нейробиологических исследованиях, особенно для изучения воздействия различных фармакологических средств на активность нейронных ансамблей. Сочетание этих методов может применяться при разработке новых терапевтических агентов для лечения или уменьшения клинических проявлений различных нейродегенеративных заболеваний. Данный подход позволяет проводить анализ Ca^{2+} - и электрофизиологической активности нейронов у свободно передвигающихся лабораторных животных, что значительно расширяет возможности исследований в области нейробиологии. Важно отметить, что эта методика может способствовать пониманию механизмов функционирования и нарушений в нейронных ансамблях, связанных с поведением, восприятием и когнитивными процессами. В дальнейшем планируется провести анализ активности нейронов гиппокампа лабораторных мышей как дикого типа, так и с моделью болезни Альцгеймера во время оценки условно-рефлекторного замирания, используя разработанный метод одновременной визуализации Ca^{2+} и регистрации ЛПП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании предложено решение по объединению гибкого полиимидного микроэлектрода с градиентной линзой минископа для одновременной визуализации Ca^{2+} -активности и электрофизиологической регистрации *in vivo* в гиппокампе взрослой мыши. Результаты, полученные в ходе данного исследования, подтверждают эффективность предложенного подхода и его применимость для изучения нейронной активности во время проводимых исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарны Большаковой Анастасии Викторовне за административную помощь, а также сотрудникам Лаборатории молекулярной нейродегенерации за помощь и полезные советы в написании статьи.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. А. И., В. Е. К., А. И. Е. и Б. И. Б.), администрирование проекта (Е. А. И., А. И. Е. и О. Л. В.), сбор данных (Е. А. И., В. Е. К. и А. И. Е.), обработка данных (Е. А. И., В. Е. К.), визуализация данных (Е. А. И., В. Е. К.), написание и редактирование манускрипта (Е. А. И., В. Е. К. и А. И. Е.), рецензирование и редактирование манускрипта (О. Л. В., Б. И. Б.), получение финансирования (Е. А. И., Б. И. Б.). Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда «Исследование кальциевой и электрофизиологической активности нейронов гиппокампа *in vivo* у мышей с моделью болезни Альцгеймера» (проект № 22–75–00028). 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 Биоэтического комитетом Петербургского политехнического университета Петра Великого, протокол № 4-n-b от 15 января 2024 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu X, Yang X, Song L, Wang Y, Li Y, Liu Y, Yang X, Wang Y, Pei W, Li W (2021) A Modified Miniscope System for Simultaneous Electrophysiology and Calcium Imaging *in vivo*. *Front Integr Neurosci* 15: 682019.
<https://doi.org/10.3389/fnint.2021.682019>
2. Erofeev AI, Vinokurov EK, Vlasova OL, Bezprozvanny IB (2023) GCaMP, a Family of Single-Fluorophore Genetically Encoded Calcium Indicators. *Rus Physiol J im IM Sechenova* 109(7): 819–843. (In Russ).
<https://doi.org/10.1134/S0022093023040142>
3. Sofroniew NJ, Flickinger D, King J, Svoboda K (2016) A large field of view two-photon mesoscope with subcellular resolution for *in vivo* imaging. *Elife* 5.
<https://doi.org/10.7554/eLife.14472>
4. Hamel EJ, Grewe BF, Parker JG, Schnitzer MJ (2015) Cellular level brain imaging in behaving mammals: an engineering approach. *Neuron* 86(1): 140–159.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.055>
5. Ahrens MB, Orger MB, Robson DN, Li JM, Keller PJ (2013) Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Methods* 10(5): 413–420.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2434>
6. Rovinsky Y, Saparin G (1992) Handbook of biological confocal microscopy, revised edition (Ed) James B. Pawley Plenum Press. New York and London (1990, 1989).
<https://doi.org/10.1002/sca.4950140210>
7. Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248(4951): 73–76.
<https://doi.org/10.1126/science.2321027>

8. Zipfel WR, Williams RM, Webb WW (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 21(11): 1369–1377.
<https://doi.org/10.1038/nbt899>
9. Ter Veer MJT, Pfeiffer T, Nagerl UV (2017) Two-Photon STED Microscopy for Nanoscale Imaging of Neural Morphology In Vivo. *Methods Mol Biol* 1663: 45–64.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7265-4_5
10. Zatoryi A, Madarasz M, Szabo A, Lorincz T, Hodovan R, Rozsa B, Fekete Z (2020) Transparent, low-autofluorescence microECog device for simultaneous Ca(2+) imaging and cortical electrophysiology in vivo. *J Neural Eng* 17(1): 016062.
<https://doi.org/10.1088/1741-2552/ab603f>
11. Erofeev A, Antifeev I, Bolshakova A, Bezprozvanny I, Vlasova O (2022) In Vivo Penetrating Microelectrodes for Brain Electrophysiology. *Sensors (Basel)* 22(23).
<https://doi.org/10.3390/s22239085>
12. Lu Y, Liu X, Hattori R, Ren C, Zhang X, Komiyama T, Kuzum D (2018) Ultra-low Impedance Graphene Microelectrodes with High Optical Transparency for Simultaneous Deep 2-photon Imaging in Transgenic Mice. *Adv Funct Mater* 28(31).
<https://doi.org/10.1002/adfm.201800002>
13. Keefer EW, Botterman BR, Romero MI, Rossi AF, Gross GW (2008) Carbon nanotube coating improves neuronal recordings. *Nat Nanotechnol* 3(7): 434–439.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2008.174>
14. Nam Y, Wheeler BC (2011) In vitro microelectrode array technology and neural recordings. *Crit Rev Biomed Eng* 39(1): 45–61.
<https://doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v39.i1.40>
15. Fan B, Wolfrum B, Robinson JT (2021) Impedance scaling for gold and platinum microelectrodes. *J Neural Eng* 18(5).
<https://doi.org/10.1088/1741-2552/ac20e5>
16. Gerwig R, Fuchsberger K, Schroepel B, Link GS, Heusel G, Kraushaar U, Schuhmann W, Stett A, Stelzle M (2012) PEDOT-CNT Composite Microelectrodes for Recording and Electrostimulation Applications: Fabrication, Morphology, and Electrical Properties. *Front Neuroeng* 5: 8.
<https://doi.org/10.3389/fneng.2012.00008>
17. Oka H, Shimono K, Ogawa R, Sugihara H, Taketani M (1999) A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *J Neurosci Methods* 93(1): 61–67.
[https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(99\)00113-2](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(99)00113-2)
18. Harris AR, Paolini AG (2017) Correlation of Impedance and Effective Electrode Area of Iridium Oxide Neural Electrodes. *Austr J Chem* 70(9): 1016–1024.
<https://doi.org/10.1071/CH17218>
19. Cai Y, Wang X, Yu X, Zhao H, Zhai Z, Wang H (2023) Auto-balancing bridge based wide impedance spectrum measurement with consideration of Op-Amp input impedance. *Rev Sci Instrum* 94(10).
<https://doi.org/10.1063/5.0167842>
20. Buzsaki G (2004) Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 7(5): 446–451.
<https://doi.org/10.1038/nn1233>
21. Cogan SF (2008) Neural stimulation and recording electrodes. *Annu Rev Biomed Eng* 10: 275–309.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160518>
22. Karumbaiah L, Saxena T, Carlson D, Patil K, Patkar R, Gaupp EA, Betancur M, Stanley GB, Carin L, Bellamkonda RV (2013) Relationship between intracortical electrode design and chronic recording function. *Biomaterials* 34(33): 8061–8074.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.016>
23. Cheung KC, Renaud P, Tanila H, Djupsund K (2007) Flexible polyimide microelectrode array for in vivo recordings and current source density analysis. *Biosens Bioelectron* 22(8): 1783–1790.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.035>
24. Kotzar G, Freas M, Abel P, Fleischman A, Roy S, Zorman C, Moran JM, Melzak J (2002) Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices. *Biomaterials* 23(13): 2737–2750.
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00007-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00007-8)
25. Kim BJ, Kuo JT, Hara SA, Lee CD, Yu L, Gutierrez CA, Hoang TQ, Pikov V, Meng E (2013) 3D Parylene sheath neural probe for chronic recordings. *J Neural Eng* 10(4): 045002.
<https://doi.org/10.1088/1741-2560/10/4/045002>
26. Johnston I, McCluskey Associate Professor D, Tan C, Tracey M (2014) Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering. *J Micromech Microengin* 24: 035017.
<https://doi.org/10.1088/0960-1317/24/3/035017>

27. Kim B, Meng E (2016) Review of polymer MEMS micromachining. *J Micromech Microengin* 26: 013001.
<https://doi.org/10.1088/0960-1317/26/1/013001>
28. Ray S (2023) How Do Local Field Potentials Measured with Microelectrodes Differ from iEEG Activity? *Intracranial EEG: A Guide Cognitiv Neuroscientists*: 273–282.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-20910-9_17
29. Fiàth R, Hofer KT, Csikós V, Horváth D, Nánási T, Tóth K, Pothof F, Böhler C, Asplund M, Ruther P, Ulbert I (2018) Long-term recording performance and biocompatibility of chronically implanted cylindrically-shaped, polymer-based neural interfaces. *Biomed Tech (Berl)* 63(3): 301–315.
<https://doi.org/10.1515/bmt-2017-0154>
30. Baek DH, Lee J, Byeon HJ, Choi H, Young Kim I, Lee KM, Jungho Pak J, Pyo Jang D, Lee SH (2014) A thin film polyimide mesh microelectrode for chronic epidural electrocorticography recording with enhanced contactability. *J Neural Eng* 11(4): 046023.
<https://doi.org/10.1088/1741-2560/11/4/046023>
31. Cruttenden CE, Taylor JM, Hu S, Zhang Y, Zhu XH, Chen W, Rajamani R (2017) Carbon Nano-Structured Neural Probes Show Promise for Magnetic Resonance Imaging Applications. *Biomed Phys Eng Express* 4(1).
<https://doi.org/10.1088/2057-1976/aa948d>
32. Prochazka A, Mushahwar VK, McCreery DB (2001) Neural prostheses. *J Physiol* 533(Pt 1): 99–109.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0099b.x>
33. Robinson FR, Johnson MT (1961) Histopathological studies of tissue reactions to various metals implanted in cat brains. *ASD Tech Rep* 61(397): 13.
34. Schweigmann M, Caudal LC, Stopper G, Scheller A, Koch KP, Kirchhoff F (2021) Versatile Surface Electrodes for Combined Electrophysiology and Two-Photon Imaging of the Mouse Central Nervous System. *Front Cell Neurosci* 15: 720675.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.720675>
35. Cecchetto C, Vassanelli S, Kuhn B (2021) Simultaneous Two-Photon Voltage or Calcium Imaging and Multi-Channel Local Field Potential Recordings in Barrel Cortex of Awake and Anesthetized Mice. *Front Neurosci* 15: 741279.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.741279>
36. Kuzum D, Takano H, Shim E, Reed JC, Juul H, Richardson AG, de Vries J, Bink H, Dichter MA, Lucas TH, Coulter DA, Cubukcu E, Litt B (2014) Transparent and flexible low noise graphene electrodes for simultaneous electrophysiology and neuroimaging. *Nat Commun* 5: 5259.
<https://doi.org/10.1038/ncomms6259>
37. Thunemann M, Lu Y, Liu X, Kilic K, Desjardins M, Vandenberghe M, Sadegh S, Saisan PA, Cheng Q, Weldy KL, Lyu H, Djurovic S, Andreassen OA, Dale AM, Devor A, Kuzum D (2018) Deep 2-photon imaging and artifact-free optogenetics through transparent graphene microelectrode arrays. *Nat Commun* 9(1): 2035.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04457-5>
38. Zhang J, Liu X, Xu W, Luo W, Li M, Chu F, Xu L, Cao A, Guan J, Tang S, Duan X (2018) Stretchable Transparent Electrode Arrays for Simultaneous Electrical and Optical Interrogation of Neural Circuits in Vivo. *Nano Lett* 18(5): 2903–2911.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b00087>
39. Donahue MJ, Kaszas A, Turi GF, Rozsa B, Slezia A, Vanzetta I, Katona G, Bernard C, Malliaras GG, Williamson A (2018) Multimodal Characterization of Neural Networks Using Highly Transparent Electrode Arrays. *eNeuro* 5(6).
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0187-18.2018>
40. Qiang Y, Artoni P, Seo KJ, Culaclii S, Hogan V, Zhao X, Zhong Y, Han X, Wang PM, Lo YK, Li Y, Patel HA, Huang Y, Sambangi A, Chu JSV, Liu W, Fagiolini M, Fang H (2018) Transparent arrays of bilayer-nanomesh microelectrodes for simultaneous electrophysiology and two-photon imaging in the brain. *Sci Adv* 4(9): eaat0626.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aat0626>
41. Renz AF, Lee J, Tybrandt K, Brzezinski M, Lorenzo DA, Cerra Cheraka M, Lee J, Helmchen F, Voros J, Lewis CM (2020) Opto-E-Dura: A Soft, Stretchable ECoG Array for Multimodal, Multiscale Neuroscience. *Adv Healthc Mater* 9(17): e2000814.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202000814>
42. Kozai TD, Vazquez AL (2015) Photoelectric artefact from optogenetics and imaging on microelectrodes and bioelectronics: New Challenges and Opportunities. *J Mater Chem B* 3(25): 4965–4978.
<https://doi.org/10.1039/C5TB00108K>

43. *Seo J-W, Kim K, Seo K-W, Kim MK, Jeong S, Kim H, Ghim J-W, Lee JH, Choi N, Lee J-Y, Lee HJ* (2020) Artifact-Free 2D Mapping of Neural Activity In Vivo through Transparent Gold Nanonetwork Array. *Advanc Funct Mater* 30(34): 2000896.
<https://doi.org/10.1002/adfm.202000896>
44. *Cho YU, Lim SL, Hong J-H, Yu KJ* (2022) Transparent neural implantable devices: a comprehensive review of challenges and progress. *npj Flexible Electron* 6(1): 53.
<https://doi.org/10.1038/s41528-022-00178-4>
45. *Engelbrecht CJ, Johnston RS, Seibel EJ, Helmchen F* (2008) Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging in vivo. *Optics Express* 16(8): 5556–5564.
<https://doi.org/10.1364/OE.16.005556>
46. *Zong W, Wu R, Chen S, Wu J, Wang H, Zhao Z, Chen G, Tu R, Wu D, Hu Y, Xu Y, Wang Y, Duan Z, Wu H, Zhang Y, Zhang J, Wang A, Chen L, Cheng H* (2021) Miniature two-photon microscopy for enlarged field-of-view, multi-plane and long-term brain imaging. *Nature Methods* 18(1): 46–49.
<https://doi.org/10.1038/s41592-020-01024-z>
47. *Zong W, Obenhaus HA, Skytoen ER, Eneqvist H, de Jong NL, Vale R, Jorge MR, Moser MB, Moser EI* (2022) Large-scale two-photon calcium imaging in freely moving mice. *Cell* 185(7): 1240–1256.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.017>
48. *Vogt N* (2022) Two-photon imaging in freely behaving mice. *Nat Methods* 19(5): 518.
<https://doi.org/10.1038/s41592-022-01502-6>
49. *Aharoni D, Khakh BS, Silva AJ, Golshani P* (2019) All the light that we can see: a new era in miniaturized microscopy. *Nat Methods* 16(1): 11–13.
<https://doi.org/10.1038/s41592-018-0266-x>
50. *Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL* (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods* 6(12): 875–881.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1398>
51. *Ghosh KK, Burns LD, Cocker ED, Nimmerjahn A, Ziv Y, Gamal AE, Schnitzer MJ* (2011) Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nat Methods* 8(10): 871–878.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1694>
52. *Flusberg BA, Nimmerjahn A, Cocker ED, Mukamel EA, Barretto RP, Ko TH, Burns LD, Jung JC, Schnitzer MJ* (2008) High-speed, miniaturized fluorescence microscopy in freely moving mice. *Nat Methods* 5(11): 935–938.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1256>
53. *Jennings JH, Ung RL, Resendez SL, Stamatakis AM, Taylor JG, Huang J, Veleta K, Kantak PA, Aita M, Shilling-Scriver K, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Otte S, Stuber GD* (2015) Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell* 160(3): 516–527.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.026>
54. *Liberti WA, Perkins LN, Leman DP, Gardner TJ* (2017) An open source, wireless capable miniature microscope system. *J Neural Eng* 14(4): 045001.
<https://doi.org/10.1088/1741-2552/aa6806>
55. *Jacob AD, Ramsaran AI, Mocle AJ, Tran LM, Yan C, Frankland PW, Josselyn SA* (2018) A Compact Head-Mounted Endoscope for In Vivo Calcium Imaging in Freely Behaving Mice. *Curr Protoc Neurosci* 84(1): e51.
<https://doi.org/10.1002/cpns.51>
56. *Zhang L, Liang B, Barbera G, Hawes S, Zhang Y, Stump K, Baum I, Yang Y, Li Y, Lin DT* (2019) Miniscope GRIN Lens System for Calcium Imaging of Neuronal Activity from Deep Brain Structures in Behaving Animals. *Curr Protoc Neurosci* 86(1): e56.
<https://doi.org/10.1002/cpns.56>
57. *de Groot A, van den Boom BJG, van Genderen RM, Coppens J, van Veldhuijzen J, Bos J, Hoedemaker H, Negrello M, Willuhn I, De Zeeuw CI, Hoogland TM* (2020) NiNscope, a versatile miniscope for multi-region circuit investigations. *Elife* 9.
<https://doi.org/10.7554/eLife.49987>
58. *Erofeev A, Antifeev I, Vinokurov E, Bezprozvanny I, Vlasova O* (2023) An Open-Source Wireless Electrophysiology System for In Vivo Neuronal Activity Recording in the Rodent Brain: 2.0. *Sensors (Basel)* 23(24).
<https://doi.org/10.3390/s23249735>
59. *Cetin A, Komai S, Eliava M, Seeburg PH, Osten P* (2006) Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nat Protoc* 1(6): 3166–3173.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.450>

60. Dong Z, Mau W, Feng Y, Pennington ZT, Chen L, Zaki Y, Rajan K, Shuman T, Aharoni D, Cai DJ (2022) Minian, an open-source miniscope analysis pipeline. *Elife* 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.70661>
61. Gerasimov E, Mitenev A, Pchitskaya E, Chukanov V, Bezprozvanny I (2023) NeuroActivityToolkit-Toolbox for Quantitative Analysis of Miniature Fluorescent Microscopy Data. *J Imaging* 9(11). <https://doi.org/10.3390/jimaging9110243>
62. Kim GH, Kim K, Lee E, An T, Choi W, Lim G, Shin JH (2018) Recent Progress on Microelectrodes in Neural Interfaces. *Materials (Basel)* 11(10). <https://doi.org/10.3390/ma11101995>
63. Viswam V, Obien MEJ, Franke F, Frey U, Hierlemann A (2019) Optimal Electrode Size for Multi-Scale Extracellular-Potential Recording From Neuronal Assemblies. *Front Neurosci* 13: 385. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00385>
64. Zutshi I, Brandon MP, Fu ML, Donegan ML, Leutgeb JK, Leutgeb S (2018) Hippocampal Neural Circuits Respond to Optogenetic Pacing of Theta Frequencies by Generating Accelerated Oscillation Frequencies. *Curr Biol* 28(8): 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.061>
65. Buzsaki G, Horvath Z, Urioste R, Hetke J, Wise K (1992) High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* 256(5059): 1025–1027. <https://doi.org/10.1126/science.1589772>
66. Chrobak JJ, Buzsaki G (1998) Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J Neurosci* 18(1): 388–398. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-01-00388.1998>
67. Kemere C, Carr MF, Karlsson MP, Frank LM (2013) Rapid and continuous modulation of hippocampal network state during exploration of new places. *PLoS One* 8(9): e73114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073114>
68. Akoglu H (2018) User's guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med* 18(3): 91–93. <https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>
69. Harrison XA (2021) A brief introduction to the analysis of time-series data from biologging studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 376(1831): 20200227. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0227>
70. Vannimetus PY, Hardouin P, Thevenon A, Walter MP, Duquesnoy B, Gluckman E, Bauters F, Delcambre B (1988) [Candida spondylodiscitis treated with itraconazole]. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 55(11): 957–958.
71. Ward MP, Rajdev P, Ellison C, Irazoqui PP (2009) Toward a comparison of microelectrodes for acute and chronic recordings. *Brain Res* 1282: 183–200. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.052>
72. Vymazal M, Vymazalova Z, Frysakova M (1984) Surgical treatment and postoperative correction using gel contact lenses in monocular congenital cataracts. *Cesk Oftalmol* 40(5): 293–298.
73. Yamada H, Kageyama N, Kato T, Sakakibara T (1981) The diagnosis of syringomyelia (author's transl. No Shinkei Geka 9(5): 573–582.
74. Coelho BJ, Pinto JV, Martins J, Rovisco A, Barquinha P, Fortunato E, Baptista PV, Martins R, Igreja R (2023) Parylene C as a Multipurpose Material for Electronics and Microfluidics. *Polymers (Basel)* 15(10). <https://doi.org/10.3390/polym15102277>
75. Hassler C, Boretius T, Stieglitz T (2011) Polymers for neural implants. *J Polymer Sci Part B: Polymer Physics* 49(1): 18–33. <https://doi.org/10.1002/polb.22169>
76. Robinson DA (1968) The electrical properties of metal microelectrodes. *Proceed IEEE* 56(6): 1065–1071. <https://doi.org/10.1109/PROC.1968.6458>
77. Buzsaki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents – EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* 13(6): 407–420. <https://doi.org/10.1038/nrn3241>
78. Neto JP, Baião P, Lopes G, Frazão J, Nogueira J, Fortunato E, Barquinha P, Kampff AR (2018) Does Impedance Matter When Recording Spikes With Polytrodes? *Front Neurosci* 12: 715. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00715>
79. Yang S, Yang Y, Geng L, Adedokun G, Xie D, Liu R, Xu L (2021) Surface Modification to Improve the Electrochemical Performance of Neural Microelectrode Arrays. 5th IEEE Electron Devices Technol & Manuf Conf (EDTM). 8–11 April 2021. 1–3.
80. Polikov VS, Tresco PA, Reichert WM (2005) Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *J Neurosci Methods* 148(1): 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.08.015>

81. *Sankar V, Patrick E, Dieme R, Sanchez JC, Prasad A, Nishida T* (2014) Electrode impedance analysis of chronic tungsten microwire neural implants: understanding abiotic vs. biotic contributions. *Front Neuroeng* 7: 13.
<https://doi.org/10.3389/fneng.2014.00013>
82. *Stringer C, Pachitariu M, Steinmetz N, Carandini M, Harris KD* (2019) High-dimensional geometry of population responses in visual cortex. *Nature* 571(7765): 361–365.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1346-5>
83. *Fu Y, Tucciarone JM, Espinosa JS, Sheng N, Darcy DP, Nicoll RA, Huang ZJ, Stryker MP* (2014) A cortical circuit for gain control by behavioral state. *Cell* 156(6): 1139–1152.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.050>
84. *Kerlin AM, Andermann ML, Berezovskii VK, Reid RC* (2010) Broadly tuned response properties of diverse inhibitory neuron subtypes in mouse visual cortex. *Neuron* 67(5): 858–871.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.002>
85. *Huber D, Gutnisky DA, Peron S, O'Connor DH, Wiegert JS, Tian L, Oertner TG, Looger LL, Svoboda K* (2012) Multiple dynamic representations in the motor cortex during sensorimotor learning. *Nature* 484(7395): 473–478.
<https://doi.org/10.1038/nature11039>
86. *Komiyama T, Sato TR, O'Connor DH, Zhang YX, Huber D, Hooks BM, Gabitto M, Svoboda K* (2010) Learning-related fine-scale specificity imaged in motor cortex circuits of behaving mice. *Nature* 464(7292): 1182–1186.
<https://doi.org/10.1038/nature08897>
87. *Grienberger C, Konnerth A* (2012) Imaging calcium in neurons. *Neuron* 73(5): 862–885.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011>
88. *Peron S, Chen TW, Svoboda K* (2015) Comprehensive imaging of cortical networks. *Curr Opin Neurobiol* 32: 115–123.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.03.016>
89. *O'Connor DH, Peron SP, Huber D, Svoboda K* (2010) Neural activity in barrel cortex underlying vibrissa-based object localization in mice. *Neuron* 67(6): 1048–1061.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.026>
90. *Hromádka T, Deweese MR, Zador AM* (2008) Sparse representation of sounds in the unanesthetized auditory cortex. *PLoS Biol* 6(1): e16.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060016>
91. *Li N, Chen TW, Guo ZV, Gerfen CR, Svoboda K* (2015) A motor cortex circuit for motor planning and movement. *Nature* 519(7541): 51–56.
<https://doi.org/10.1038/nature14178>
92. *Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohuan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS* (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499(7458): 295–300.
<https://doi.org/10.1038/nature12354>
93. *Maravall M, Mainen ZF, Sabatini BL, Svoboda K* (2000) Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys J* 78(5): 2655–2667.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76809-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76809-3)
94. *Wei Z, Lin BJ, Chen TW, Daie K, Svoboda K, Druckmann S* (2020) A comparison of neuronal population dynamics measured with calcium imaging and electrophysiology. *PLoS Comput Biol* 16(9): e1008198.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008198>
95. *Dhawale AK, Poddar R, Wolff SB, Normand VA, Kopelowitz E, Olveczky BP* (2017) Automated long-term recording and analysis of neural activity in behaving animals. *Elife* 6.
<https://doi.org/10.7554/eLife.27702>
96. *Tolias AS, Ecker AS, Siapas AG, Hoenselaar A, Keliris GA, Logothetis NK* (2007) Recording chronically from the same neurons in awake, behaving primates. *J Neurophysiol* 98(6): 3780–3790.
<https://doi.org/10.1152/jn.00260.2007>
97. *Barbera G, Liang B, Zhang L, Li Y, Lin DT* (2019) A wireless miniScope for deep brain imaging in freely moving mice. *J Neurosci Methods* 323: 56–60.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.05.008>
98. *Silva AJ* (2017) Miniaturized two-photon microscope: seeing clearer and deeper into the brain. *Light Sci Appl* 6(8): e17104.
<https://doi.org/10.1038/lsa.2017.104>

**Integration of Single-Photon Miniature Fluorescence Microscopy
and Electrophysiological Recording Methods for *in Vivo* Studying Hippocampal
Neuronal Activity**

**A. I. Erofeev^{a, #}, E. K. Vinokurov^a, I. E. Antifeev^b, O. L. Vlasova^a,
and I. B. Bezprozvanny^{a, c}**

*^aInstitute of Biomedical Systems and Biotechnology, Peter the Great St. Petersburg polytechnic
university, St. Petersburg, Russia*

^bInstitute of Analytical Instrumentation, St. Petersburg, Russia

*^cDepartment of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX,
United States of America*

[#]e-mail: alexandr.erofeew@gmail.com

The miniature single-photon fluorescent microscope (miniscope) enables the visualization of calcium activity *in vivo* in freely moving laboratory animals, providing the capability to track cellular activity during the investigation of memory formation, learning, sleep, and social interactions. However, the use of calcium sensors for *in vivo* imaging is limited by their relatively slow (millisecond-scale) kinetics, which complicates the recording of high-frequency spike activity. The integration of methods from single-photon miniature fluorescent microscopy with electrophysiological recording, which possesses microsecond resolution, represents a potential solution to this issue. Such a combination of techniques allows for the simultaneous recording of optical and electrophysiological activity in a single animal *in vivo*. In this study, a flexible polyimide microelectrode was developed and integrated with the gradient lens of the miniscope. The *in vivo* tests conducted in this research confirmed that the microelectrode combined with the gradient lens facilitates simultaneous single-photon calcium imaging and local field potential recording in the hippocampus of an adult mouse.

Keywords: hippocampus, calcium imaging, miniscope, electrophysiology, microelectrodes, *in vivo*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**НАРУШЕНИЯ ВОЛНЫ N170 СЛУХОВЫХ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ
КАК РЕЗУЛЬТАТ ПАТОЛОГИИ ПРОЦЕССА ЭЛИМИНАЦИИ СИНАПСОВ
У БОЛЬНЫХ ПАРАНОИДНОЙ ШИЗОФРЕНИЕЙ С ПЕРВЫМ
ПСИХОТИЧЕСКИМ ПРИСТУПОМ**

© 2024 г. А. Ю. Архипов¹, Г. И. Родионов¹*, В. Б. Стрелец¹

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

*E-mail: sooperego@ya.ru

Поступила в редакцию 30.11.2023 г.

После доработки 28.03.2024 г.

Принята к публикации 14.04.2024 г.

В работе исследовалась реакция корковых структур на слуховые стимулы разной эмоциональной значимости (связанные с бредом и галлюцинациями и нейтральные) в норме ($n = 15$; 7 мужчин, 8 женщин) и у больных параноидной шизофренией ($n = 24$; 11 мужчин, 13 женщин), с высшим или средним специальным образованием и приблизительно равным уровнем социального благополучия, в компоненте N170 слухового вызванного потенциала (ВП). У здоровых испытуемых обнаружено достоверное увеличение амплитуды и укорочение латентности волны N170 в правой центрально-париетальной области на эмоционально-значимые стимулы, что подчеркивает большую выраженность активации коры на данный тип стимулов. Наряду с общим снижением активации коры головного мозга, характерным для больных параноидной шизофренией, по данным большинства научных источников в этом компоненте ВП, наше исследование выявило одновременное увеличение обоих параметров ВП–амплитуды и латентности в лобных областях и их снижение в центральных и височных–явление, которое названо нами парадоксальным эффектом (ПЭ). ПЭ у больных развивается в ответ на эмоционально-значимые стимулы–слова, ассоциированные с бредом и псевдогаллюцинациями, в норме вызывающие повышение активации. Таким образом, исследование подтверждает нашу гипотезу, что на слуховых ВП обнаруживаются ПЭ, как и на зрительных, что было обнаружено нами ранее в предыдущих исследованиях. Тот факт, что ПЭ наблюдается на волне N170 слухового вызванного потенциала (СВП), то есть на том же втором этапе восприятия, что и в зрительном (ЗВП), может указывать на общий для этих модальностей характер данной реакции. Однако поскольку слуховой стимул более короткий и компактный, чем изображение, реакция на него более ранняя. В связи с этим ПЭ на слуховой стимул развивается на волне N170, тогда как на зрительный–в более позднем компоненте P200. Таким образом, при шизофрении уже через 170 мс после предъявления стимула в ответ на значимые стимулы обнаруживается «конфликт» между возбуждением и торможением, в результате которого развиваются ПЭ. О «родстве» ПЭ, обнаруженных при шизофрении на ЗВП и СВП, свидетельствуют и данные о сходном характере распространения в коре головного мозга возбуждения с одновременным увеличением или уменьшением обоих параметров компонента ВП N170. Предполагается, что выявленные нарушения связаны с характерным для шизофрении патологическим протеканием процесса элиминации синапсов–так называемого прунинга, результатом которого является избыток синапсов в лобных областях в сочетании с их дефицитом в центральных областях коры.

Ключевые слова: шизофрения, слуховой вызванный потенциал, синаптический прунинг

DOI: 10.31857/S0869813924070105, **EDN:** BDKDBH

ВВЕДЕНИЕ

Одной из гипотез этиологии шизофрении является гипотеза о патологическом развитии нейронных связей в онтогенезе [1]. Были выдвинуты предположения о двух противоположных патогенетических механизмах, приводящих к аномальной нейронной связности. Оба они связаны с нарушением при шизофрении элиминации синапсов в процессе синаптического прунинга: результатом прунинга становится или избыток синапсов или их недостаток.

Первая гипотеза основывается на том, что если синапсов остается слишком много и между ними обнаруживается слишком тесная связь (гиперконнективность), это препятствует проведению и обработке информации. Гиперконнективность была выявлена Feinberg на основе данных о повышении уровня синхронизации между фронтальными и передне-височными областями коры мозга на ЭЭГ у больных шизофренией [2]. Эти физиологические данные, по предположению Feinberg, связаны с возникновением первого психотического приступа и продуктивных симптомов при шизофрении (бред и псевдогаллюцинации).

Вторая идея, напротив, основана на предположении о том, что после слишком активного прунинга образуется дефицит синапсов, сопровождающийся нарушением синаптической связности (гипотеза гипоконнективности) [3]. В поддержку этой гипотезы свидетельствуют данные об уменьшении плотности серого вещества при шизофрении, особенно в дорсолатеральной префронтальной и в центральных областях коры, где наблюдается уменьшение числа или размера аксонов, а также дендритных ветвей, шипиков и синапсов. Указанные особенности служат причиной ослабления связи между нейронами и могут, по мнению авторов, лежать в основе патогенеза шизофрении.

Таким образом, патологическое протекание синаптической элиминации (прунинга) может привести к аномальной связности между кортикальными нейронами, то есть к гипер-, гипо- или «неправильной» связности, создавая физиологической предпосылку развития шизофрении. Относительно позднее начало психотической фазы на втором десятилетии жизни предполагает что регрессивные события, в частности, синаптический прунинг в пубертатном возрасте могут способствовать возникновению продуктивной симптоматики, что не исключает неправильного прорастания и/или миелинизации корковых аксонов и дендритов и после возникновения симптомов [4].

В поддержку нарушения при шизофрении связности между различными составляющими нейросети (между корковыми областями, между новой и старой корой, между корой и подкоркой (гиппокамп) и между корковыми нейронами) писали Uhlhaas и Singer [5], Tononi и Edelman [6]. Последние авторы указывали, что синхронизация нейронной активности обеспечивает взаимодействие в группах нейронов и сигналах между связанными нейронами, которое в норме даёт начало формированию упорядоченного поведения системы на базе хаотической динамики отдельных элементов этой системы, ключевым понятием здесь является синхронизация [7].

Наиболее адекватным физиологическим показателем, отражающим выраженность или синхронизацию нейронного ответа на раздражитель, являются вызванные потенциалы (ВП) мозга, ранние компоненты которых представляют информацию о физических характеристиках стимулов, а поздние—об их значимости.

Отражение физических характеристик стимула—интенсивности, длительности наблюдается прежде всего в проекционных зонах каждого анализатора и прилежащих к ним областях, где и происходит наиболее подробный анализ параметров раздражителя. В ВП мозга это наиболее ранние части ответа на раздражитель каждой конкретной модальности, в частности, это P100 зрительного вызванного потенциала (ЗВП) и N100 слухового вызванного потенциала (СВП) [8]. По мере удаления от проекционной зоны

анализатора специфические для этого анализатора участки коры, отражающие сенсорную информацию о раздражителе, постепенно сменяются участками, отражающими информацию о его значимости для данного субъекта, что проявляется в более поздних компонентах ВП (N170, P200, P300), которые уже более широко распределены по коре головного мозга [9].

Наши предыдущие исследования, проведенные с помощью анализа ВП коры, показали, что при шизофрении нарушается адекватная реакция на поступающие в мозг сигналы. В одних мозговых областях реакция оказывается чрезмерной, в других – ослабленной, т.е. нарушения «поведения» мозговой системы могут быть связаны с тем, что мозг как бы приуменьшает или преувеличивает поступающие в него сигналы [10]. Если у здоровых людей в ВП на более значимые стимулы амплитуда компонентов больше, а латентность меньше, чем на стандартные (активация), то у больных параноидной шизофренией в ответ на зрительные стимулы нами выявлен парадоксальный эффект (ПЭ). ПЭ заключается в том, что в ответ на значимые стимулы и амплитуда и латентность компонентов ВП одновременно увеличиваются или одновременно уменьшаются.

В норме такое явление никогда не наблюдается. Понимание физиологической основы ВП позволяет определить характер синаптических нарушений, обуславливающих такие проявления как ПЭ.

В случае парадоксального эффекта с одновременным увеличением параметров ВП (первый тип ПЭ) мы можем судить об увеличении числа нейронов, вовлеченных в обработку сигнала, и, следовательно, об увеличении числа синаптических контактов, срабатывающих в рамках данной реакции, однако рост числа нервных клеток не объясняется возбуждением, так как не сокращается латентность, что говорило бы о значимости стимула. Таким образом, увеличение латентности характеризует физиологические особенности синапсов, которые мы, в силу низкой возбудимости и медленного срабатывания, называем аберрантными.

В случае ПЭ с одновременным сокращением амплитуды и латентного периода (второй тип ПЭ) мы можем судить о низком суммарном потенциале, то есть небольшом количестве синапсов, участвующих в ответе на стимул, и небольшом времени, которое требуется для включения максимально доступного количества нейронов в реакцию.

Таким образом, исследование биоэлектрической активности мозга методом ВП позволяет сделать вывод о количестве и качественном состоянии синапсов по результатам прунинга.

Распределение в коре зон, обнаруживающее первый или второй тип парадоксального эффекта, поможет описать характер протекания синаптической элиминации как процесса, определяющего число синапсов в тех или иных участках мозга.

На материале зрительных стимулов парадоксальный эффект был выявлен, в частности, в компоненте N170, который отражает этап сличения сенсорных параметров стимула с информацией об их значимости в прошлом опыте, то есть с памятью [11]. В результате этого «информационного синтеза» формируется субъективное восприятие данного стимула. Нарушение восприятия значимости стимулов определяет некоторые когнитивные проявления при шизофрении.

Таким образом, вместо усиления возбуждения на значимый стимул при шизофрении возникает процесс, при котором невозможно определить преобладание ни возбуждения, ни торможения, что, как уже упоминалось, связано с последствиями патологического синаптического прунинга.

Процесс прунинга филогенетически начинается в раннем детском возрасте в затылочных областях и постепенно продвигается кпереди через центральные и височные области, достигая лобных и префронтальных областей коры. В норме синаптическая элиминация, по данным исследований с помощью световой микроскопии, в корково-

корковых аксональных системах составляет около 60%, что показано в зрительной и префронтальной коре [12].

Подлежащие элиминации синапсы являются исключительно возбуждающими контактами и поэтому считается, что синаптический прунинг имеет решающее значение для баланса процессов возбуждения и торможения в коре головного мозга взрослого человека [13]. Известным фактом нарушения при шизофрении является дисбаланс процессов возбуждения и торможения в коре мозга, основную роль в котором играют количество и качество синаптических контактов [14].

Проведение исследования на слуховом анализаторе позволит судить, является ли ПЭ феноменом, характерным только для зрительной модальности, или является выражением фундаментального патологического механизма, который будет не только проявляться в разных модальностях восприятия, но и в целом характеризовать нарушение проведения импульсов в нервной системе при шизофрении.

Цель нашей работы – исследование нарушения активации коры головного мозга при шизофрении по характеристикам параметров ВП – латентности и амплитуды; а также проверка гипотезы, что на СВП будут наблюдаться ПЭ, как на ЗВП, которая позволит судить о генерализованном характере данной реакции при заболевании параноидной шизофренией.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование проводилось с использованием метода анализа ВП мозга в ответ на вербальные слуховые стимулы в двух выборках: 1) группа пациентов ($n = 24$; 13 мужчин, 11 женщин) с параноидной шизофренией в состоянии психоза, не получавших медикаментозной терапии, общая сумма баллов выраженности психопатологических симптомов по шкале PANSS в группе больных составляла 97.1 ± 3.1 ; 2) группа здоровых испытуемых ($n = 15$; 8 мужчин, 7 женщин), аналогичная по возрасту (от 18 до 35 лет), уровню образования (среднее специальное, неоконченное высшее, высшее) и с приблизительно равным уровнем социального благополучия.

Критерием исключения для участия в эксперименте были органические расстройства ЦНС и употребление психоактивных веществ в анамнезе. При отборе в группу контроля исключались кандидаты с психотическими эпизодами в анамнезе, а также имеющие родственников с психотическими расстройствами. Участники обеих групп – правши со здоровым слухом.

Для предъявления стимулов использовалась программа Presentation (США). Стимулы предъявлялись бинаурально, через наушники, громкость предъявления варьировала около 60 дБ (громкость разговорной речи). Эксперимент проводился в тихой, затемненной комнате, участники сидели с закрытыми глазами. Предъявлялось 2 типа стимулов: нейтральные слова и слова эмоционально-значимые, связанные с бредом и галлюцинациями, полученные путем контент-анализа из речи пациентов с галлюцинаторно-параноидным синдромом. Все стимулы были одно- двусловными словами, время подачи стимула не превышало 0.5 с. Примеры нейтральных стимулов: «река», «небо», «земля». Примеры эмоционально-значимых стимулов: «нож», «враг», «страх». Предъявлялось 40 стимулов каждого типа, порядок предъявления – случайный. Стимулы каждого типа были озвучены мужским и женским голосами, таким образом, всего было 80 стимулов каждого типа, в силу этого на протяжении предъявления каждое слово-стимул повторялось 2 раза. Межстимульный интервал варьировал от 1.5 до 3 с. Испытуемым группы исследования и контрольной выборки предъявлялись одни и те же стимулы. Испытуемые были проинструктированы, что эксперимент проводится в имплицитных условиях, то есть не предполагает ни мысленной, ни поведенческой активности в ответ на стимул.

Регистрация ЭЭГ проводилась на 32-канальном усилителе фирмы Neuroscan (США) от 30 отведений (отведения для регистрации глазодвигательной активности не учитывались). Использовались отведения: Fp1, Fp2, Fz, F3, F4, F7, F8, Fcz, Fc3, Fc4, Ft7, Ft8, Cz, C3, C4, T3, T4, Cpz, Cp3, Cp4, Tp7, Tp8, Pz, P3, P4, T5, T6, Oz, O1, O2. Электрод заземления располагался на отведении Fpz. Референты располагались на мочках ушей. Electroды располагались по модифицированной международной схеме 10/20, частота дискретизации 200 Гц. Фильтрация осуществлялась на уровне от 0.5 до 70 Гц. Импеданс соблюдался в границах не выше 10 кОм. Для вычисления базовой линии использовались средние значения записи.

Для обработки ЭЭГ и выделения ВП использовался программный пакет EEG Lab (BSD, США), артефакты удалялись вручную. В записях нормативной выборки количество удаленных эпох достигало не более 5%, тогда как в группе пациентов процент удаленных эпох колебался от 5% до 15%. Были исключены записи, в которых после удаления артефактов осталось менее 80% стимулов. Активность в ответ на стимул определялась по пиковой латентности во временных окнах: от 150 до 210 мс для компонента N170. Определение пика амплитуды проводилось по максимальным числовым значениям в интересующем временном окне.

Статистическая обработка показателей латентности и амплитуды в ответ на стимулы производилась с использованием программы Statistica-11. Для проверки гипотезы о различии в восприятии стимулов при внутригрупповом сравнении использовался непараметрический критерий Вилкоксона. Для межгруппового сравнения применялся непараметрический критерий Манна – Уитни. Для коррекции множественных сравнений применялся метод Бенджамини – Хохберга (FDR) [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Межгрупповое сравнение

При сопоставлении реакции коры мозга на нейтральные стимулы у двух групп испытуемых обнаружено, что в норме в лобно-центральной области по средней линии (FCZ) амплитуда компонента N170 достоверно больше, чем у больных, а латентность меньше (табл. 1, рис. 1). Процесс активации у здоровых испытуемых выражен больше, чем у больных шизофренией.

При сопоставлении реакции в ответ на эмоционально-значимые стимулы обнаружено, что у здоровых испытуемых амплитуда компонента N170 достоверно выше, чем у больных, а латентность меньше в правой центральной (C4), правой задне-височной (T6), левой центрально-париетальной (CP3), правой лобно-центральной (FC4) и левой нижне-височной (TP7) областях (табл. 2.) Таким образом, процесс активации у здоровых людей выражен больше, чем у больных.

Таблица 1. Латентность и амплитуда здоровых испытуемых (N) и пациентов с параноидной шизофренией (Sz) в ответ на нейтральные стимулы

	Амплитуда N на нейтральный стимул	Амплитуда Sz на нейтральный стимул	p-значение		Латентность N на нейтральный стимул	Латентность Sz на нейтральный стимул	p-значение
Fcz	-4.13 (1.11)	-2.29 (0.93)	0.003		176.00 (11.84)	199.00 (15.97)	0.005

Цифры в скобках – величина стандартного отклонения SD.

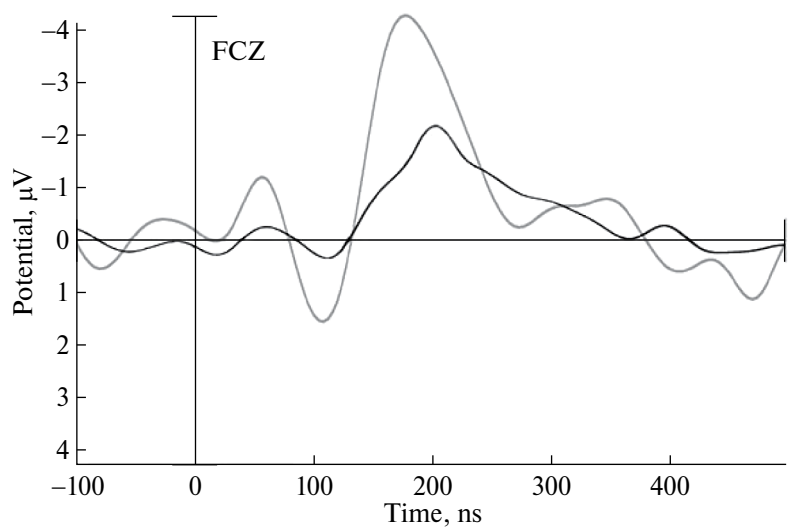


Рис. 1. Активация коры на эмоционально-значимый раздражитель у здоровых испытуемых по сравнению с больными шизофренией во фронто-центральной области по средней линии. ВП здоровых испытуемых обозначен серой линией, ВП пациентов с параноидной шизофренией отмечен черным цветом.

Таблица 2. Латентность и амплитуда здоровых испытуемых (N) и пациентов с параноидной шизофренией (Sz) в ответ на эмоционально- значимые стимулы

	Амплитуда N на значимый стимул	Амплитуда Sz на значимый стимул	<i>p</i> -значение		Латентность N на значимый стимул	Латентность Sz на значимый стимул	<i>p</i> -значение
C4	-3.85 (0.92)	-1.88 (1.65)	0.004		190.00 (9.81)	206.00 (11.96)	0.004
T6	-3.05 (0.69)	-1.89 (0.92)	0.004		171.00 (10.34)	207.00 (12.39)	0.003
Cp3	-3.74 (0.62)	-2.10 (1.03)	0.005		174.00 (12.26)	206.00 (12.63)	0.004
Fc4	-4.03 (1.10)	-2.27 (1.52)	0.001		181.00 (11.15)	203.00 (14.60)	0.003
Tr7	-3.07 (0.94)	-1.90 (1.86)	0.002		182.00 (10.69)	201.00 (13.21)	0.004

Цифры в скобках – величина стандартного отклонения *SD*.

Внутригрупповое сравнение

При внутригрупповом сравнении у здоровых испытуемых обнаружено достоверное увеличение амплитуды (нейтральный – 3.03, значимый – 3.51) и укорочение латентности (нейтральный 179.5, значимый 176.5) волны N170 в правой центрально-парietальной области (CP4) $p = 0.004$ на эмоционально-значимые стимулы, что подчеркивает большую выраженность активации коры на эмоционально-значимый раздражитель (рис. 2).

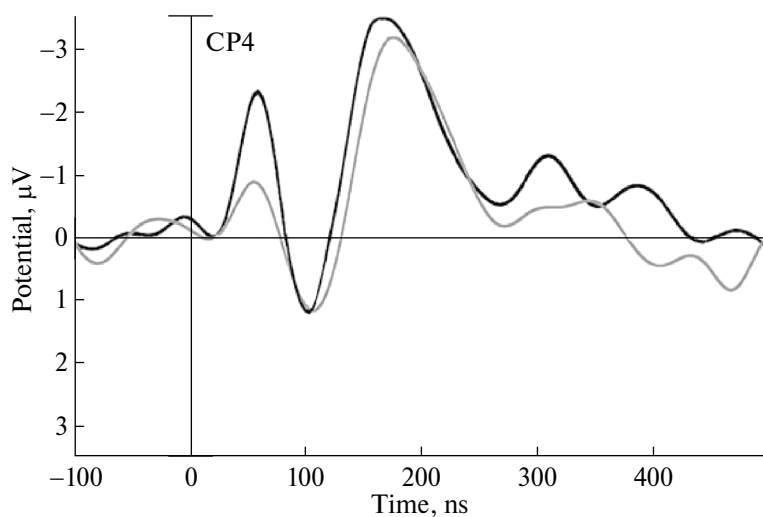


Рис. 2. Активация коры на эмоционально-значимый раздражитель по сравнению с нейтральным у здоровых испытуемых в правой центрально-теменной области. ВП на нейтральный стимул обозначен серой линией, ВП на эмоционально-значимый стимул – черной линией.

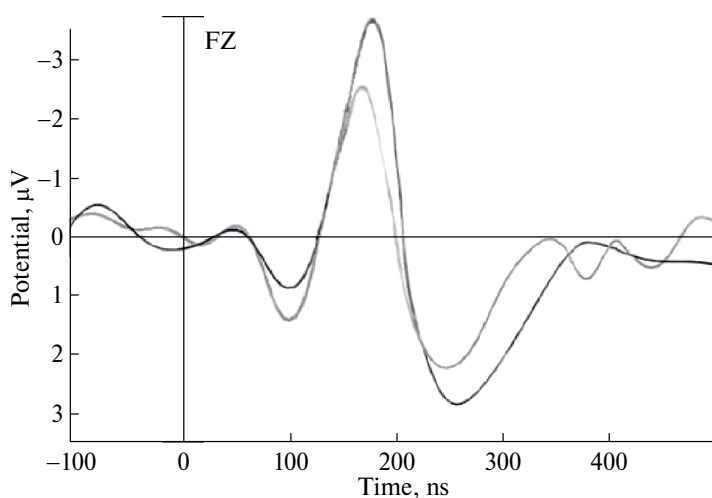


Рис. 3. ПЭ с одновременным увеличением латентности и амплитуды волны N170 в центральной лобной области по средней линии у больных шизофренией. ВП на нейтральный стимул обозначен серой линией, ВП на эмоционально-значимый стимул – черной линией.

Внутригрупповое исследование показало, что у больных шизофренией в лобных (Fp1), (Fp2) и лобно-височных (F7), (F8) областях обоих полушарий, а также в лобной области по средней линии (FZ) наблюдается одновременное увеличение обоих параметров – амплитуды ($p = 0.001$) и латентности ($p = 0.001$) компонента N170 на более значимые стимулы по сравнению с нейтральными (рис. 3). Таким образом, нами выявлен ПЭ с увеличением обоих параметров – латентности и амплитуды волны N170 слуховых ВП в передних областях коры (табл. 3).

Таблица 3. Численные значения ПЭ с увеличением обоих параметров – амплитуды (A) и латентности (L) волны N170 у пациентов с параноидной шизофренией

Отведение	Neutral	<i>p</i> -значение		Significant	<i>p</i> -значение
Fp1	A –2.04 (0.76)	0.001		A –2.93 (0.75)	0.001
	L 172.00 (22.66)	0.001		L 185.00 (19.55)	0.003
Fp2	A –1.99 (0.88)	0.001		A –3.09 (0.66)	0.002
	L 176.00 (14.31)	0.001		L 185.00 (20.27)	0.004
F7	A –1.84 (0.83)	0.001		A –2.64 (0.73)	0.001
	L 165.00 (20.85)	0.001		L 178.00 (17.37)	0.002
F8	A –2.03 (0.70)	0.001		A –2.86 (0.63)	0.003
	L 170.00 (19.38)	0.001		L 185.00 (14.14)	0.004
Fz	A –2.41 (0.71)	0.001		A –3.45 (0.88)	0.004
	L 172.00 (19.42)	0.001		L 183.00 (18.88)	0.003

Обозначения: A – амплитуда (мКв), L – латентность (ms). Столбец Neutral – значения на нейтральные стимулы. Столбец Significant – значения на эмоционально-значимые стимулы. Цифры в скобках обозначают величину стандартного отклонения *Sd*.

В левых центральных (C3), центральных по средней линии (CZ) и лобно-центральных областях по средней линии (FCZ) у больных, напротив, имеет место уменьшение и амплитуды ($p = 0.002$), и латентности ($p = 0.002$) компонента N170 ВП на значимые стимулы по сравнению с нейтральными. В этих областях коры нами обнаружен ПЭ с уменьшением обоих параметров волны N170 – латентности и амплитуды (табл. 4).

Таблица 4. Численные значения ПЭ с уменьшением обоих параметров – амплитуды и латентности волны N170 у пациентов с параноидной шизофренией

Отведение	Neutral	<i>p</i> -значение		Significant	<i>p</i> -значение
C3	A –2.44 (0.59)	0.002		A –1.70 (0.86)	0.002
	L 180.00 (19.98)	0.002		L 170.00 (4.50)	0.002
Cz	A –3.53 (0.80)	0.002		A –2.43 (0.79)	0.002
	L 183.00 (20.67)	0.002		L 168.00 (12.99)	0.002
FcZ	A –3.57 (0.60)	0.002		A –2.29 (0.98)	0.002
	L 185.00 (11.97)	0.002		L 172.00 (16.42)	0.002

Обозначения: A – амплитуда, L – латентность. Столбец Neutral – значения на нейтральные стимулы. Столбец Significant – значения на эмоционально-значимые стимулы. Цифры в скобках обозначают величину стандартного отклонения *Sd*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Межгрупповое сравнение показало, что в норме активация на оба типа стимулов в префронтальных областях коры мозга больше, чем у больных шизофренией, это подтверждает нарушение при шизофрении реакции активации.

Внутригрупповое исследование показало, что у больных шизофренией в лобных и лобно-височных областях обоих полушарий, а также в лобных областях по средней линии наблюдается увеличение и амплитуды, и латентности волны N170 на значимые стимулы. В левых центральных, лобно-центральных областях обоих полушарий и центральных областях по средней линии у больных, напротив, отмечается уменьшение и амплитуды и латентности компонента N170 (рис. 4).

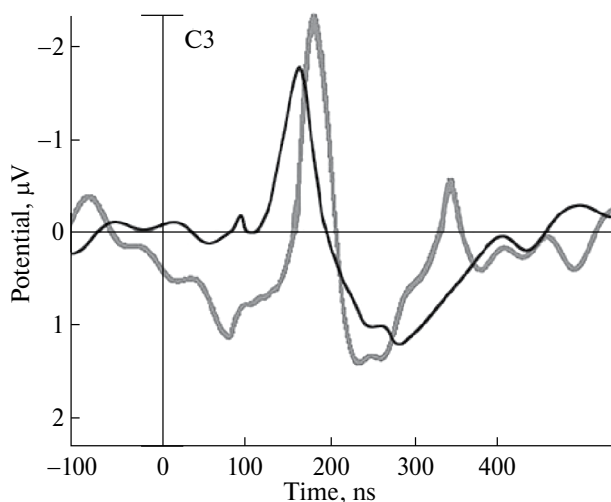


Рис. 4. ПЭ с одновременным уменьшением латентности и амплитуды волны N170 в левой центральной области у больных шизофренией. ВП на нейтральный стимул обозначен серой линией, ВП на эмоционально-значимый стимул – черной линией.

Если условно разделить восприятие на 3 этапа: первый, сенсорный или этап анализа физических параметров стимула, второй, информационный или этап синтеза информации о физических свойствах стимулов с информацией об его значимости, и третий – этап принятия когнитивного решения, то волна N170 является отражением второго, промежуточного этапа [11]. Наличие ПЭ в компоненте N170 указывает на патологию при шизофрении второго этапа, информационного синтеза, когда формируется субъективное восприятие стимула. При этом в ответ на значимые стимулы в норме усиливается корковая активация – уменьшается латентность и увеличивается амплитуда волны N170, а при шизофрении развивается патологическая реакция, которую мы назвали парадоксальным эффектом (ПЭ), когда оба параметра компонентов ВП или увеличиваются, или уменьшаются.

ПЭ в ВП у больных нельзя связать ни с процессом возбуждения, ни торможения, вероятно, это конфликт обоих механизмов. Данное anomальное состояние обусловлено нарушением синаптического прунинга, что отражается в ВП двумя типами проявлений. Первый – в виде одновременного уменьшения латентности и амплитуды, и второй – увеличение обоих этих параметров. ПЭ с уменьшением латентности и ам-

плитуды, вероятно, обусловлен меньшим количеством нейронов, активирующихся на стимул (снижение амплитуды), и уменьшением времени обработки информации за счет меньшего количества синапсов (уменьшение латентности) из-за избыточного прунинга в центральных областях коры. ПЭ с увеличением латентности и амплитуды объясняется большим количеством синапсов, вовлеченных в реакцию на стимул (увеличение амплитуды), что вызвано недостаточностью процесса элиминации во фронтальных отделах коры, однако время реакции (пиковая латентность) также увеличивается за счет количества активирующихся нейронов. Важно отметить, что указанные синапсы в силу патологического прунинга остаются функционально неполноценными, aberrантными, и, таким образом, речь идет как об изменении количества, так и качества синапсов [16].

Важно отметить, что процесс синаптического прунинга распространяется с затылочных областей, через центральные в передние, что, возможно, объясняется эволюционной и онтогенетической динамикой развития нервной системы [17].

Вероятно, у больных до возникновения психоза в центральных отделах коры присутствует избыточное количество синапсов, и к моменту, когда процесс прунинга запускается в лобных отделах, в центрально-теменных областях количество и функция синапсов уже нарушается. В это же время происходящий в лобных отделах процесс элиминации синапсов недостаточен, что в итоге приводит к неоднородности элиминации и синаптической негомогенности – то есть избытку синапсов в передних областях коры и недостатке – в центральных. Исходя из этого, мы предполагаем, что при шизофрении для условий возникновения первого психотического эпизода и преобладания в клинической картине продуктивных симптомов необходимо не только разное соотношение количества синапсов в передних и центральных отделах коры, но и присутствие aberrантных синапсов в передних областях. Эти синапсы в свою очередь в процессе течения заболевания также инактивируются при слабой элиминации, что в итоге приводит к уменьшению плотности серого вещества при шизофрении и преобладанию в клинической картине болезни негативных симптомов [18].

Обращает на себя внимание тот факт, что области коры, в которых при шизофрении развиваются ПЭ в слуховой и зрительной модальности, совпадают: в лобных областях это ПЭ с увеличением обоих параметров компонентов ВП, а в центральных и некоторых височных и париетальных областях – с уменьшением обоих этих параметров. Однако на зрительном анализаторе ПЭ выявляется позже, на волне P200 и P300, вероятно, из-за разницы физических особенностей раздражителя [19].

Следует отметить, что результаты нашего исследования могут быть связаны с результатами, полученными прежде другими авторами в биохимических и морфологических исследованиях мозга при шизофрении. Так, доминирующая в науке дофаминовая гипотеза предполагает нарушение баланса процессов возбуждения и торможения в нервной системе при шизофрении, что также находит отражение в наших результатах, а повышенная выработка дофамина может объясняться повышенным количеством синапсов во фронтальных отделах мозга или их aberrантным характером. Морфологические исследования мозга больных шизофренией *post mortem* дают информацию об увеличении размера желудочков и о повышенной плотности белого вещества в лобных областях, что может находить логичное объяснение через призмму наших результатов. Такие умозаключения, конечно, носят предположительный характер, но являются целью дальнейших междисциплинарных исследований.

Обнаружение ПЭ у больных параноидной шизофренией дает возможность подойти к анализу нарушений синаптической элиминации и описать её негомогенность, а также оценить неравномерность количественного и качественного распределения синапсов в коре головного мозга. Это позволяет наблюдать одновременно подтверждение гипотезы гиперконнективности в передних отделах коры по Feinberg [2] и гипотезы гипоконнективности в центральных областях по Friston, Frith [20], указывая на избы-

ток синапсов в передних и их дефицит в центральных областях мозга, и, таким образом, приводит к пониманию роли прунинга в возникновении аномальной связности и конфликта процессов возбуждения-торможения при шизофрении.

Отдельное внимание следует обратить на тот факт, что такое сочетание амплитуды и латентности не может наблюдаться в норме, в результате чего ПЭ можно рассматривать как биологический маркер заболевания, имеющий большое значение как для диагностики, так и в моделях предсказания риска развития данной патологии [21].

Поскольку больные в психозе, в отличие от нормы, продемонстрировали наличие ПЭ, можно утверждать, что гетерогенность процесса элиминации, формирующая синаптическую негомогенность в коре головного мозга, является обязательным условием для возникновения психоза. При этом распределение неоднородности элиминации таково, что количество синапсов в центральных областях коры мозга снижено, а в лобных – увеличено преимущественно за счет избыточных аберрантных синапсов.

Подавляющее большинство исследований, основанных на методе ВП, обнаруживает преобладание торможения в мозге при шизофрении, опираясь отдельно на показатели латентности, которые демонстрируют увеличение времени обработки информации или отдельно на уменьшение амплитуды, что также указывает на снижение активации [22–25]. В нашем исследовании был использован более строгий критерий и учитывались лишь те отведения, в которых отмечались статистически значимые отличия сразу на оба параметра – и латентности и амплитуды. Такой подход, ранее не применявшийся другими исследователями, позволил выявить неадекватное сочетание показателей амплитуды и латентности, то есть выявить конфликтную реакцию, которую нельзя отнести ни к процессу возбуждения, ни к процессу торможения. Таким образом, нами впервые был описан ПЭ, наблюдающийся в мозге при шизофрении.

На основании полученных данных были сделаны следующие выводы:

1. В норме реакция активации как на значимые, так и на нейтральные стимулы во всех областях коры, показавших статистически значимые отличия, больше, чем у больных шизофренией, что отражает нарушение активации коры при этом заболевании.
2. Парадоксальные эффекты в ответ на стимулы проявляются на слуховых ВП, так же, как и на зрительных и могут рассматриваться в качестве биологического маркера заболевания.
3. ПЭ с одновременным увеличением обоих параметров компонента ВП N170 (латентности и амплитуды) развиваются у больных шизофренией на значимые стимулы, по сравнению с нейтральными, в лобных областях.
4. ПЭ с уменьшением обоих параметров компонента ВП N170 на значимые стимулы развиваются у больных шизофренией в центральных областях коры.
5. Наблюдающаяся негомогенность синапсов в различных областях коры – дефицит в центральных областях коры и избыток синапсов с нарушенной функцией в лобных областях формирует конфликт процессов возбуждения и торможения и может провоцировать возникновение психоза у больных шизофренией, то есть может являться пусковым механизмом психоза.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

А. Ю. А. – регистрация ЭЭГ, обработка записей, статистическая обработка результатов, работа с источниками, работа по написанию статьи. Г. И. Р. – регистрация ЭЭГ, обработка записей, статистическая обработка результатов, работа с источниками, работа по написанию статьи. В. Б. С. – регистрация ЭЭГ, обработка записей, статистическая обработка результатов, работа с источниками, работа по написанию статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств Российского научного фонда (проект № 22–25–00706). 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 Института высшей нервной деятельности Российской академии наук, протокол № 1 от 24 января 2023 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. *Fatemi SH, Folsom TD* (2009) The Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia, Revisited. *Schizophr Bull* 35(3): 528–548.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbn187>
2. *Feinberg I* (1982) Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J Psychiatr Res* 17(4): 319–334.
[https://doi.org/10.1016/0022-3956\(82\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0022-3956(82)90038-3)
3. *Beaumont JC, Dimond S* (1973) Brain disconnection and schizophrenia. *Br J Psychiatry* 123: 661–662.
<https://doi.org/10.1192/bjp.123.661>
4. *Marenco S, Weinberger D* (2000) The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: Following a trail of evidence from cradle to grave. *Development and Psychopathol* 12(3): 501–527.
<https://doi.org/10.1017/S0954579400003138>
5. *Uhlhaas PJ, Singer W* (2012) Neuronal dynamics and neuropsychiatric disorders: toward a translational paradigm for dysfunctional large-scale Networks. *Neuron* 75(6): 963–980.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.004>
6. *Tononi G, Edelman GM* (1998) Consciousness and complexity. *Science* 282(5395): 1846–1851.
<https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1846>
7. *Иваницкий АМ, Стрелец ВБ, Корсаков ИА* (1984) Информационные процессы мозга и психическая деятельность. М. Наука. [*Ivanitskiy AM, Strelets VB, Korsakov IA* (1984) Information processes of the brain and mental activity. M. Nauka. (In Russ)].
8. *Vogel EK, Luck SJ* (2000) The visual N1 component as an index of a discrimination process. *Psychophysiology* 37(2): 190–203.
<https://doi.org/10.1111/1469-8996.3720190>
9. *Busey TA, Vanderkolk JR* (2005) Behavioral and electrophysiological evidence for configural processing in fingerprint experts. *Vision Res* 45(4): 431–448
<https://doi.org/10.1016/j.visres.2004.08.021>
10. *Стрелец ВБ, Родионов ГИ, Нурбеков МК, Ушаков ВЛ, Архипов АЮ* (2021) Анализ парадоксальных нейрофизиологических реакций на разных этапах восприятия отрицательных эмоциональных стимулов у больных шизофренией. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 107(1): 119–132. [*Strelets VB, Rodionov GI, Nurbekov MK, Ushakov VL, Arkhipov AYU* (2021) Analysis of Paradoxical Neurophysiological Reactions at Different Stages of Perception of Negative Emotional Stimuli in Patients with Schizophrenia. *Russ J Physiol* 107(1): 119–132. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S086981392101012X>
11. *Иваницкий АМ* (1996) Мозговая основа субъективных переживаний: гипотеза информационного синтеза. *Журн высш нервн деятельн* 46(2): 241. [*Ivanitskiy AM* (1996) The brain basis of subjective experiences: the information synthesis hypothesis. *J Higher Nerv Activ* 46(2): 241. (In Russ)].

12. *Faust TE, Gunner G, Schafer DP* (2021) Mechanisms governing activity-dependent synaptic pruning in the developing mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci* 22(11): 657–673.
<https://doi.org/10.1038/s41583-021-00507-y>
13. *Zecevic N, Bourgeois J-P, Rakic P* (1989) Changes in synaptic density in motor cortex of rhesus monkey during fetal and postnatal life. *Dev Brain Res* 50: 11–32.
14. *Uhlhaas PJ, Singer W* (2013) High-frequency oscillations and the neurobiology of schizophrenia. *Dialog Clin Neurosci* 15(3): 301–313.
<http://dx.doi.org/10.31887/DCNS.2013.15.3/puhlhaas>
15. *Hochberg Y, Benjamini Y* (1990) More powerful procedures for multiple significance testing. *Statist Med* 9 (7): 811–818.
<https://doi.org/10.1002/sim.4780090710>
16. *Hunt MJ, Kopell NJ, Traub RD, Whittington MA* (2017) Aberrant network activity in schizophrenia. *Trends Neurosci* 40(6): 371–382.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.003>
17. *Somel M, Liu X, Khaitovich P* (2013) Human brain evolution: transcripts, metabolites and their regulators. *Nat Rev Neurosci* 14: 112–127.
<https://doi.org/10.1038/nrn3372>
18. *Glahn DC, Laird AR, Ellison-Wright I, Thelen SM, Robinson JL, Lancaster JL, Bullmore E, Fox PT* (2008) Meta-analysis of gray matter anomalies in schizophrenia: application of anatomic likelihood estimation and network analysis. *Biol Psychiatry* 64(9): 774–781.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.03.031>
19. *Folstein JR, Van Petten C* (2008) Influence of cognitive control and mismatch on the N2 component of the ERP: a review. *Psychophysiology* 45(1): 152–170.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2007.00602.x>
20. *Friston KJ, Frith CD* (1995) Schizophrenia: a disconnection syndrome. *Clin Neurosci* 3(2): 89–97.
21. *Carter JW, Schulsinger BA, Parnas J, Cannon T, Mednick SA* (2002) A Multivariate Prediction Model of Schizophrenia. *Schizophr Bull* 28(4): 649–682.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.a006971>
22. *Shagass C, Straumanis JJ Jr, Roemer RA, Amadeo M* (1977) Evoked potentials of schizophrenics in several sensory modalities. *Biol Psychiatry* 12(2): 221–235.
23. *Симонова НА, Гаракх ЖВ, Зайцева ЮС, Шмуклер АБ* (2014) Нейрофизиологические механизмы нарушения зрительного восприятия при шизофрении. *Социал клин психиатр* 24(1): 81–89. [*Symonova NA, Garakh JV, Zaytseva YuS, Shmukler AB* (2014) Neurophysiological mechanisms of visual perception violation in schizophrenia. *Social Klin Psihiatr* 24(1): 81–89. (In Russ)].
24. *Алфимова МВ, Лебедева ИС, Томышев АН, Ахадов ТА, Семенова НА, Помыткин АН, Каледда ВГ* (2016) Вербальная беглость на начальных этапах шизофрении: структурные и нейрофизиологические корреляты. *Социал клин психиатр* 4: 5–11. [*Alfimova MV, Lebedeva IS, Tomishev AN, Ahadov TA, Semenova NA, Pomytkin AN, Kaleda VG* (2016) Verbal fluency in early schizophrenia stages: structural and neurophysiological correlates. *Social Klin Psihiatr* 4: 5–11. (In Russ)].
25. *Бочкарев ВК, Солнцева СВ, Киренская АВ, Ткаченко АА* (2020) Сравнительное исследование характеристик волны P300 и вызванного тета-ритма при шизофрении и расстройствах личности. *Журн неврол психиатр им. СС Корсакова* 120 (3): 41–47. [*Bochkarev VK, Solnceva SV, Kirenskaia AV, Tkachenko AA* (2020) A comparative study of the P300 wave and evoked theta-rhythm in schizophrenia and personality disorders. *SS Korsakov J Neurol Psychiatr* 120(3): 41–47. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17116/jnevro202012003141>

**Disturbances of the Process of Synaptic Elimination and its Reflection in the Wave N170
of Auditory Evoked Potential (AEP) in First Psychotic Episode
of Paranoid Schizophrenia**

A. Ju. Arkhipov^{a,*}, G. I. Rodionov^{a,*}, and V. B. Strelets^a

^aInstitute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

**e-mail: sooperego@ya.ru*

The reaction of cortical structures of different significance (associated with delusions and hallucination and neutral ones) was studied. The work was conducted in patients with paranoid schizophrenia and normal control (24 patients with paranoid schizophrenia, 15 controls). In patients in frontal areas paradox effect (PE) in AEPs with the increase of both parameters of N170 component was revealed. In central and temporal areas PEs were found in N170 component with the decrease of both parameters of this component. These results point to the “conflict” between the processes of excitation and inhibition in schizophrenia. In schizophrenia patients PEs were revealed in auditory and visual modalities (EVPs and VEPs) on the N170 wave with the unidirectional shifts (increase and decrease) of both parameters in the same cortical areas in AEPs and VEPs. It is supposed that ERP disturbances revealed in patients with schizophrenia are due to the pathology of the synaptic pruning causing the imbalance of excitation-inhibition and leading to the psychosis onset.

Keywords: schizophrenia; auditory evoked potential; pruning