

# РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 109, № 2  
февраль  
2023



## СОДЕРЖАНИЕ

---

### Обзорные и проблемные статьи

- Метаанализ экспериментальных исследований влияния монотерапии мелатонином на уровень циркулирующих триглицеридов, холестерина, глюкозы и инсулина в зависимости от диеты крыс  
*Н. В. Кузьменко, В. А. Цырлин, М. Г. Плисс* 139
- 

### Экспериментальные статьи

- Белок YB-1 предотвращает возрастное снижение уровня эстрадиола в плазме крови у трансгенных стареющих самок мышей 5xFAD  
*Д. Ю. Жданова, В. И. Ковалев, А. В. Чаплыгина, Н. В. Бобкова, Р. А. Полтавцева, Г. Т. Сухих* 163
- Летальная агрессия у содержащихся в неволе обезьян  
*В. Г. Чалян, Н. В. Мейшвили, И. Г. Пачулия, Е. Н. Аникаева, Д. В. Задорожный* 178
- Влияние инсулина на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра и функциональное состояние афферентных входов из аркуатного ядра крыс  
*А. Н. Инюшкин, К. А. Мистрюгов, О. В. Ледеяева, И. Д. Романова, Т. С. Исакова, А. А. Инюшкин* 192
- Применение метода цветового кодирования для анализа эффектов галоперидола на поведение животных в тесте "Открытое поле"  
*М. С. Макаров, Ю. И. Сысоев, М. К. Гузенко, В. А. Приходько, Э. Коркотян, С. В. Оковитый* 214
- Участие ацетилхолина и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в регуляции роста скелетных мышц куриного эмбриона  
*Е. В. Лопатина, А. В. Гавриченко, Н. А. Пасатецкая* 229
- 

### Методические статьи

- Межполушарная симметрия и асимметрия пик-волновых разрядов абсансного типа, вызванных системным введением пентилентетразола  
*А. С. Ершова, Е. М. Сулейманова, А. А. Грищенко, Л. В. Виноградова, И. В. Сысоев* 241
- Применение малоинвазивного беспроводного метода регистрации ЭЭГ и функциональных нагрузок для оценки эпилептиформной активности у самцов крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии  
*Д. С. Синяк, Г. А. Буков, В. В. Сизов, О. Е. Зубарева, Д. В. Амахин, А. В. Зайцев* 252
- 
-

# CONTENTS

---

## Reviews

- Meta-Analysis of Experimental Studies of the Effect of Melatonin Monotherapy on the Level of Circulation Triglycerides, Cholesterol, Glucose and Insulin Depending on the Diet of Rats  
*N. V. Kuzmenko, V. A. Tsyrlin, and M. G. Pliss* 139
- 

## Experimental Articles

- YB-1 Protein Prevents Age Decline in Plasma Estradiol in 5xFAD Transgenic Aging Female Mice  
*D. Yu. Zhdanova, V. I. Kovalev, A. V. Chaplygina, N. V. Bobkova, R. A. Poltavtseva, and G. T. Sukhikh* 163
- Lethal Aggression in Captive Monkeys  
*V. G. Chalyan, N. V. Meishvili, I. G. Pachulia, E. N. Anikaeva, and D. V. Zadorojnii* 178
- The Effects of Insulin on Spike Activity of the Suprachiasmatic Nucleus Neurones and Functional State of Afferent Inputs from the Arcuate Nucleus in Rats  
*A. N. Inyushkin, K. A. Mistryugov, O. V. Ledyeva, I. D. Romanova, T. S. Isakova, and A. A. Inyushkin* 192
- Use of Colour Coding to Assess the Effects of Haloperidol on Animal Behaviour in the Open Field Test  
*M. S. Makarov, Yu. I. Sysoev, M. K. Guzenko, V. A. Prikhodko, E. Korkotian, and S. V. Okovityi* 214
- The Involvement of Acetylcholine and Na,K-ATPase in the Regulation of Skeletal Muscle Growth  
*E. V. Lopatina, A. V. Gavrichenko, and N. A. Pasatetskaya* 229
- 

## Methodological Articles

- Interhemispheric Symmetry and Asymmetry of Absence Type Spike-Wave Discharges Caused by Systemic Administration of Pentylentetrazole  
*A. S. Ershova, E. M. Suleymanova, A. A. Grishchenko, L. V. Vinogradova, and I. V. Sysoev* 241
- A Minimally Invasive Method of Wireless Electroencephalogram Recording in Rats in a Lithium—Pilocarpine Model of Epilepsy  
*D. S. Sinyak, G. A. Bukov, V. V. Sizov, O. E. Zubareva, D. V. Amakhin, and A. V. Zaitsev* 252
- 
-

---

---

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ  
СТАТЬИ

---

---

**МЕТААНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛИЯНИЯ  
МОНОТЕРАПИИ МЕЛАТОНИНОМ НА УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ  
ТРИГЛИЦЕРИДОВ, ХОЛЕСТЕРИНА, ГЛЮКОЗЫ И ИНСУЛИНА  
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДИЕТЫ КРЫС<sup>1</sup>**

© 2023 г. Н. В. Кузьменко<sup>1, 2, \*</sup>, В. А. Цырлин<sup>1</sup>, М. Г. Плисс<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. академика И.П. Павлова, Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: nat.kuzmenko2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.11.2022 г.

После доработки 10.01.2023 г.

Принята к публикации 13.01.2023 г.

Известно, что мелатонин модулирует суточные и сезонные ритмы метаболизма. Однако до сих пор неясен эффект продолжительного приема экзогенного мелатонина на параметры липидного и углеводного обмена при различных диетах. В данной работе мы провели метаанализ 53 публикаций, исследующих влияние монотерапии мелатонином на показатели липидного и углеводного обмена у крыс, содержащихся на стандартной диете (44 публикации), а также на диетах с повышенным содержанием фруктозы (7 публикаций), жиров (11 публикаций) и холестерина (5 публикаций). По литературным данным диета, обогащенная фруктозой, вызывала у крыс существенное повышение уровня триглицеридов, глюкозы и инсулина. У крыс, находящихся на диете, обогащенной жирами, наблюдалось увеличение уровня триглицеридов, общего холестерина (ОХ), инсулина и снижение концентрации липопротеинов высокой плотности (ЛВП). У крыс, содержащихся на диете, обогащенной холестерином, наблюдалось увеличение уровня ОХ и снижение концентрации ЛВП. Терапия мелатонином снижала уровень триглицеридов, ОХ и инсулина, но не изменяла уровень глюкозы у крыс, содержащихся на диетах, обогащенных фруктозой и жирами. При диете, обогащенной холестерином, мелатонин (без учета дозы) снижал уровень ОХ и увеличивал уровень ЛВП и глюкозы, но не изменял концентрацию триглицеридов. Наш метаанализ не выявил положительного эффекта увеличения дозы мелатонина при обогащенных диетах. При стандартной диете длительная терапия мелатонином также снижала уровень инсулина, но не оказывала влияния на ОХ и увеличивала уровень глюкозы. Ухудшение показателей углеводного обмена было ассоциировано с более высокими дозами мелатонина в начале терапии, с внутривнутривенным введением или с введением через желудочный зонд, с введением в светлую фазу. Кроме того, высокие дозы мелатонина были ассоциированы с ухудшением показателей липидного обмена при стандартной диете. Эффект мелатонина был направлен в сторону минимизации изменений в липидном профиле, вызванных диетой, что подтверждает гомеостатическую роль мелатонина в метаболизме липидов.

**Ключевые слова:** мелатонин, фруктоза, жиры, инсулин, триглицериды, холестерин, глюкоза

**DOI:** 10.31857/S0869813923020061, **EDN:** NDTFDK

---

<sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0869813923020061 для авторизованных пользователей.

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что гормон эпифиза мелатонин регулирует суточные и сезонные изменения в общем метаболизме позвоночных. К настоящему времени появилось много сообщений об эффективности мелатонина в нормализации показателей липидного профиля и резистентности к инсулину у людей с метаболическими нарушениями [1–4]. Это позволяет рассматривать мелатонин в качестве альтернативного метода профилактики и терапии метаболических нарушений, тем более что он имеет минимальные побочные эффекты.

Установлено, что помимо пинеальной железы мелатонин синтезируется практически во всех органах и тканях, включая различные отделы головного мозга, щитовидную железу, желудочно-кишечный тракт, печень, поджелудочную железу [5]. Кроме того, практически все ткани и органы имеют мелатонинергические рецепторы (MT). Эффекты мелатонина на общий метаболизм могут реализовываться через MT-рецепторы и посредством антиоксидантного действия мелатонина [2, 6–9]. Показано, что мелатонин ингибирует биосинтез и всасывание холестерина, а также увеличивает его распад и защищает клетки от токсического действия окисленных липопротеинов [2, 6]. Было подтверждено, что мелатонин улучшает чувствительность к инсулину, индуцирует регенерацию  $\beta$ -клеток в поджелудочной железе, способствует синтезу гликогена в печени [7]. Дефицит мелатонина в результате пинеалэктомии вызывал увеличение уровня триглицеридов, холестерина, глюкозы и инсулина у крыс [10, 11]. Также сниженный синтез мелатонина был ассоциирован с риском развития инсулинорезистентности и диабета 2-го типа у людей [12, 13].

Несмотря на то, что метаанализы клинических исследований [1–4] показали положительный эффект мелатонина на параметры липидного и углеводного обмена, до сих пор остается неясным зависимость этого эффекта от дозы и продолжительности терапии, а также от диеты. Кроме того, в клинических исследованиях часто мелатонин комбинируют с другими препаратами. К настоящему времени проведено много экспериментальных работ на крысах, исследующих влияние монотерапии мелатонином на уровень триглицеридов, холестерина, инсулина и глюкозы в условиях стандартной диеты, а также при диетах с повышенным содержанием углеводов (фруктозы), жиров и холестерина. Наша статья посвящена метаанализу результатов этих исследований.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метаанализ был выполнен в соответствии с рекомендациями PRISMA (<http://www.prisma-statement.org>). Поиск исследований осуществлялся летом–осенью 2022 г. на английском и русском языках независимо двумя людьми в базах PubMed, Scopus, Google Scholar, elibrary без ограничения периода публикации. При поиске были использованы ключевые слова, характеризующие параметры липидного и углеводного обмена (липиды, углеводы, триглицериды, холестерин, липопротеины, глюкоза, инсулин), которые сочетались с воздействием (мелатонин, терапия мелатонином, инфузия мелатонина), объектом исследования (крысы, диета, корм, фруктоза, жиры, холестерин). Кроме того, дополнительно были просмотрены списки литературы публикаций, отобранных для метаанализа.

В метаанализ были включены исследования только монотерапии мелатонином. Отбирались только те работы, в которых животные содержались в стандартных лабораторных условиях при освещении 12:12 или 14:10 день/ночь. Были исключены исследования, в которых крысы находились при постоянных или непропорционально длительной темноте или освещении. Если в публикации не были уточнены условия содержания, то мы считали, что животные содержались в стандартных лабораторных условиях. Также мы исключили экспериментальные работы, постав-

ленные на линиях крыс, чувствительных к изменению фотопериода (например Fisher) и с генетическими нарушениями метаболизма (например Zucker). Были исключены работы, исследующие влияние мелатонина на модели диабета/метаболического синдрома, вызванного введением токсичных веществ. В метаанализ включались исследования, проведенные только на интактных или ложнооперированных животных. Исключались работы с использованием новорожденных или слишком старых крыс, а также беременных самок. Кроме того, были исключены публикации, в которых результаты были отображены в непонятной форме, не позволяющей оценить среднее значение и  $SD/SEM$ .

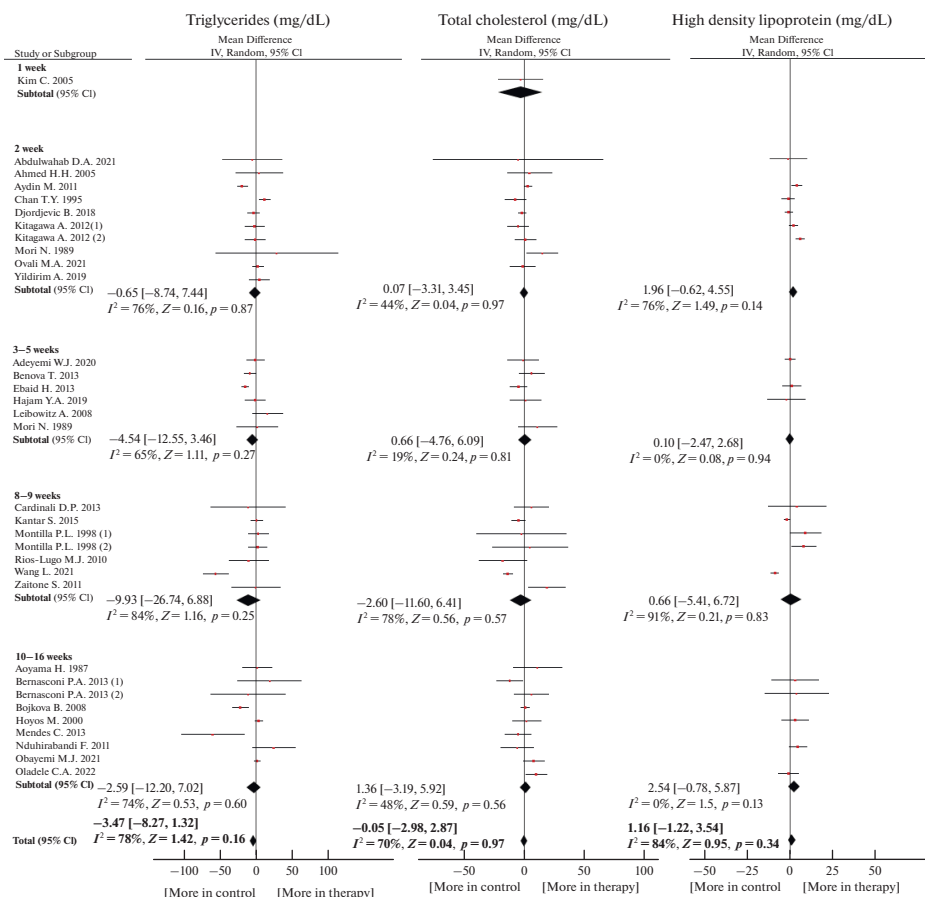
Из отобранных работ извлекались данные по уровню в крови триглицеридов, общего холестерина (ОХ), липопротеинов высокой плотности (ЛВП), глюкозы и инсулина в контрольной группе и в группе животных, которые находились на терапии мелатонином. После извлечения из публикаций значения исследуемых биохимических показателей были переведены в одинаковые единицы измерения с помощью online калькулятора <http://unitslab.com/ru> (мг/дл — для концентрации триглицеридов, ОХ, ЛВП и глюкозы, мМЕ/л — для концентрации инсулина). Если в публикации концентрация инсулина была представлена в весовой форме, то она сначала переводилась в молярную, а затем с помощью <http://unitslab.com/ru> в мМЕ/л. Если данные были представлены отдельно для самцов и самок, то рассчитывалось среднее арифметическое.

При проведении метаанализа отдельно исследовались крысы на стандартной диете, на диете с повышенным содержанием фруктозы, на диете с повышенным содержанием жиров и на диете, обогащенной холестерином. Далее данные объединялись в субгруппы по времени терапии мелатонином (без учета дозы). Кроме того, там, где позволяло количество исследований, был проведен анализ зависимости эффекта от дозы, способа и времени введения мелатонина.

Метаанализ результатов исследований проводился с помощью статистической программы Review Manager 5.3 (Cochrane Library). Для анализа был использован inverse variance тест (Mean Difference). Гетерогенность включенных в метаанализ исследований устанавливали по критерию  $I^2$ . Выбор модели фиксированных или рандомизированных эффектов осуществлялся в соответствии с рекомендациями [14]. Для оценки статистической значимости суммарных результатов применялся Z-тест. Предвзятость при отборе публикаций проверялась с помощью графика — воронки. Доверительный интервал — 95%. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ . В тексте данные приведены в виде медианы и интерквартильного размаха или в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По теме метаанализа в базах было найдено 1672 публикации, из них 74 обзора литературы. Было отобрано 53 работы [15–67], исследующих влияние монотерапии мелатонином на показатели липидного и углеводного обмена у крыс при различных диетах. Основные характеристики исследований представлены в таблице S (Приложение), о рандомизации при выделении контрольной и опытной группы сообщалось в 23 публикациях. Терапия мелатонином продолжалась от 1 до 16 нед. Мелатонин вводился животным орально (через зонд или с питьевой водой), внутривенно и подкожно в дозах 0.15–50 мг/кг/день. В 13 работах мелатонин вводили перед или в темную фазу, в 12 — до полудня, в остальных работах — время введения не указано. В 31 работе сообщается о сборе крови натощак, в 2 работах [32, 55] авторы пишут, что крысы не голодали перед сбором крови, в остальных работах авторы не уточняют этот момент.

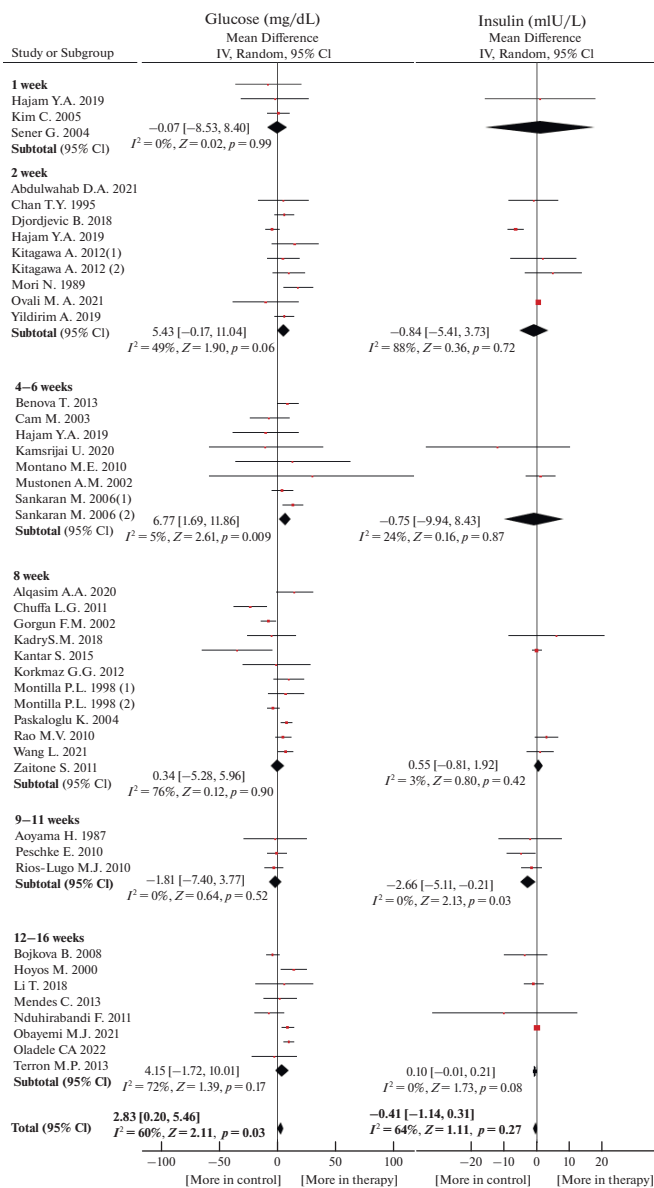


**Рис. 1.** Влияние терапии мелатонином на уровень триглицеридов, общего холестерина и липопротеинов высокой плотности у крыс, содержащихся на стандартной диете.

$I^2$  – гетерогенность,  $Z$  – суммарный эффект,  $p$  – значимость различий. Метаанализ проведен без стандартизации по дозе, способу и времени введения.

### Стандартная диета

Всего было найдено 44 публикации, изучающие влияние терапии мелатонином на показатели липидного и углеводного обмена у крыс, содержащихся на стандартной диете. В 27 работах исследовалось влияние введения мелатонина на уровень циркулирующих триглицеридов и ОХ, в 16 работах – на уровень ЛВП, в 37 работах – на уровень глюкозы, в 18 – на уровень инсулина (табл. S). У крыс, содержащихся на стандартной диете, средний уровень триглицеридов был  $88 \pm 47$  мг/дл ( $M \pm SD$ ), ОХ –  $79 \pm 38$  мг/дл, ЛВП –  $38 \pm 18$  мг/дл, глюкозы –  $118 \pm 35$  мг/дл, инсулина –  $21 \pm 15$  мМЕ/л. Терапия мелатонином в дозе 0.1–40 мг/кг/день продолжалась в течение 1–16 нед. и не оказывала (без учета дозы) существенного влияния на уровень циркулирующих триглицеридов, ОХ и ЛВП у крыс, содержащихся на стандартной диете (рис. 1). Однако при этом на 2–6-й нед. терапии у крыс наблюдалось увеличение уровня глюкозы на  $5.51 [1.98, 9.05]$  мг/дл,  $I^2 = 28\%$ ,  $Z = 3.06$ ,  $p = 0.002$ , а на 9–11-й неделе – снижение уровня инсулина на  $-2.66 [-5.11, -0.22]$  мМЕ/л,  $I^2 = 0\%$ ,  $Z = 2.13$ ,  $p = 0.03$  (рис. 2).



**Рис. 2.** Влияние терапии мелатонином на уровень глюкозы и инсулина у крыс, содержащихся на стандартной диете.

$I^2$  – гетерогенность,  $Z$  – суммарный эффект,  $p$  – значимость эффекта. Метаанализ проведен без стандартизации по дозе, способу и времени введения.

Анализ зависимости эффекта от дозы без учета продолжительности терапии показал увеличение ЛВП и уменьшение инсулина при низких, но не при высоких дозах мелатонина. Изменение других показателей не зависело от дозы (рис. 3). Однако анализ зависимости эффекта мелатонина от дозы с учетом продолжительности терапии показал, что через 2 нед. терапии мелатонин в дозе  $\geq 10$  мг/кг/день вызы-

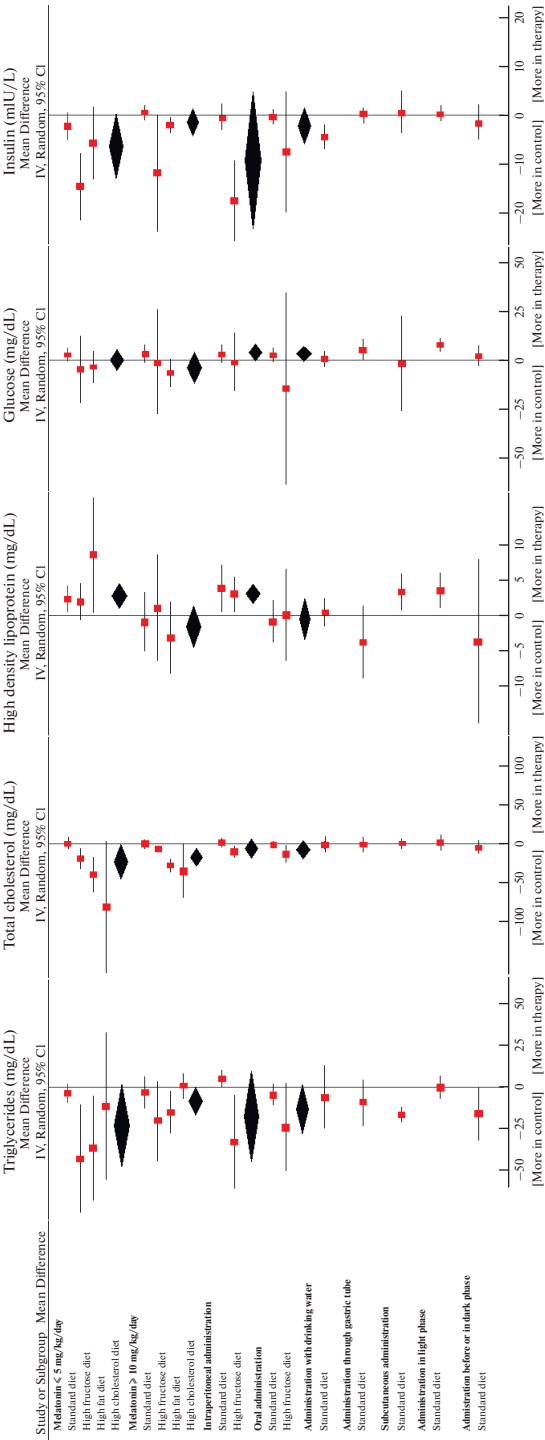


Рис. 3. Влияние дозы, способа и времени введения мелатонина на показатели липидного профиля, глюкозу и инсулин у крыс при разных диетах.  $I^2$  – гетерогенность, Z – суммарный эффект, p – значимость эффекта. Метаанализ проведен без дополнительной стандартизации.

**Таблица 1.** Зависимость от дозы эффекта мелатонина на показатели липидного и углеводного обмена у крыс, содержащихся на стандартной диете

| Неделя терапии                         | Доза мелатонина | N работ | Объем выборки мелатонин/контроль | Средняя разность       | $I^2$ , % | Z    | p     | Тест на различия между субгруппами, p |
|----------------------------------------|-----------------|---------|----------------------------------|------------------------|-----------|------|-------|---------------------------------------|
| Триглицериды (мг/дл)                   |                 |         |                                  |                        |           |      |       |                                       |
| 2-я                                    | ≤ 1 мг/кг/день  | 3       | 21/21                            | −8.86 [−20.66, 2.93]   | 79        | 1.47 | 0.14  | 0.03                                  |
| 2-я                                    | ≥ 10 мг/кг/день | 5       | 31/31                            | 5.77 [0.33, 11.21]     | 10        | 2.08 | 0.04  |                                       |
| 8-я                                    | ≤ 1 мг/кг/день  | 2       | 14/14                            | 2.80 [−6.82, 12.42]    | 0         | 0.57 | 0.57  | 0.32                                  |
| 8-я                                    | ≥ 10 мг/кг/день | 3       | 28/28                            | −18.91 [−60.19, 22.38] | 94        | 0.90 | 0.37  |                                       |
| Общий холестерин (мг/дл)               |                 |         |                                  |                        |           |      |       |                                       |
| 2-я                                    | ≤ 1 мг/кг/день  | 3       | 21/21                            | −0.18 [−4.35, 4.00]    | 66        | 0.08 | 0.93  | 0.83                                  |
| 2-я                                    | ≥ 10 мг/кг/день | 5       | 31/31                            | 0.75 [−6.88, 8.39]     | 51        | 0.19 | 0.85  |                                       |
| 8-я                                    | ≤ 1 мг/кг/день  | 2       | 14/14                            | 1.81 [−22.24, 25.86]   | 0         | 0.15 | 0.88  | 0.75                                  |
| 8-я                                    | ≥ 10 мг/кг/день | 3       | 28/28                            | −2.49 [−14.49, 9.52]   | 90        | 0.41 | 0.68  |                                       |
| Липопротеины высокой плотности (мг/дл) |                 |         |                                  |                        |           |      |       |                                       |
| 2-я                                    | ≤ 1 мг/кг/день  | 3       | 21 / 21                          | 1.61 [−1.11, 4.34]     | 71        | 1.16 | 0.25  | 0.90                                  |
| 2-я                                    | ≥ 10 мг/кг/день | 3       | 17 / 17                          | 2.00 [−3.80, 7.80]     | 80        | 0.68 | 0.50  |                                       |
| 8-я                                    | ≤ 1 мг/кг/день  | 2       | 14 / 14                          | 8.43 [2.83, 14.02]     | 0         | 2.95 | 0.003 | 0.003                                 |
| 8-я                                    | ≥ 10 мг/кг/день | 2       | 18 / 18                          | −5.29 [−12.30, 1.72]   | 96        | 1.48 | 0.14  |                                       |
| Глюкоза (мг/дл)                        |                 |         |                                  |                        |           |      |       |                                       |
| 2-я                                    | ≤ 1 мг/кг/день  | 3       | 19 / 19                          | 2.12 [−8.35, 12.60]    | 54        | 0.40 | 0.69  | 0.31                                  |
| 2-я                                    | ≥ 10 мг/кг/день | 5       | 31 / 31                          | 8.48 [2.26, 14.69]     | 6         | 2.67 | 0.008 |                                       |
| 8-я                                    | ≤ 1 мг/кг/день  | 5       | 46 / 43                          | −0.32 [−12.58, 11.94]  | 80        | 0.05 | 0.96  | 0.96                                  |
| 8-я                                    | ≥ 10 мг/кг/день | 6       | 52 / 50                          | 0.03 [−6.94, 7.00]     | 65        | 0.01 | 0.99  |                                       |
| Инсулин (мМЕ/л)                        |                 |         |                                  |                        |           |      |       |                                       |
| 2-я                                    | ≤ 1 мг/кг/день  | 2       | 13 / 13                          | −3.69 [−11.53, 4.14]   | 62        | 0.92 | 0.36  | 0.29                                  |
| 2-я                                    | ≥ 10 мг/кг/день | 3       | 18 / 18                          | 0.50 [0.15, 0.86]      | 0         | 2.80 | 0.005 |                                       |

$I^2$ —гетерогенность, Z — суммарный эффект, p — значимость различий.

вал значимое повышение уровня триглицеридов, глюкозы и инсулина, однако через 8 нед. этот эффект терапии не был выражен при любой дозе (табл. 1). Эффект мелатонина на концентрацию ОХ не зависел от дозы, однако через 8 нед. терапии мелатонин в дозе ≤1 мг/кг/день вызывал увеличение ЛВП, а в дозе ≥10 мг/кг/день, наоборот, незначительное уменьшение ЛВП (табл. 1).

Мы оценили влияние способа введения мелатонина на его эффекты при стандартной диете без учета дозы и продолжительности терапии. Терапия мелатонином вызывала значимое повышение уровня триглицеридов и ЛВП при внутрибрюшинном введении; значимое снижение уровня триглицеридов и увеличение ЛВП — при подкожном введении; значимое снижение уровня инсулина — при введении с питьевой водой (рис. 3). Наиболее сильно уровень глюкозы повышался при внутрибрюшинном введении и при введении через желудочный зонд (рис. 3). Не было существенного влияния способа введения мелатонина на его эффект на уровень ОХ (рис. 2). Однако большой разброс по дозам и продолжительности терапии не позволяет нам сделать окончательный вывод. Если сравнивать отдельные работы, в которых использовались одинаковые дозы мелатонина, то после 2 нед. терапии введение мелатонина в дозе 10 мг/кг/день через зонд [15] и внутрибрюшинно [40] не оказывало эффекта на уровень триглицеридов, ОХ, глюкозы и инсулина, но внутрибрюшинное введение повышало концентрацию ЛВП. После 3 нед. терапии

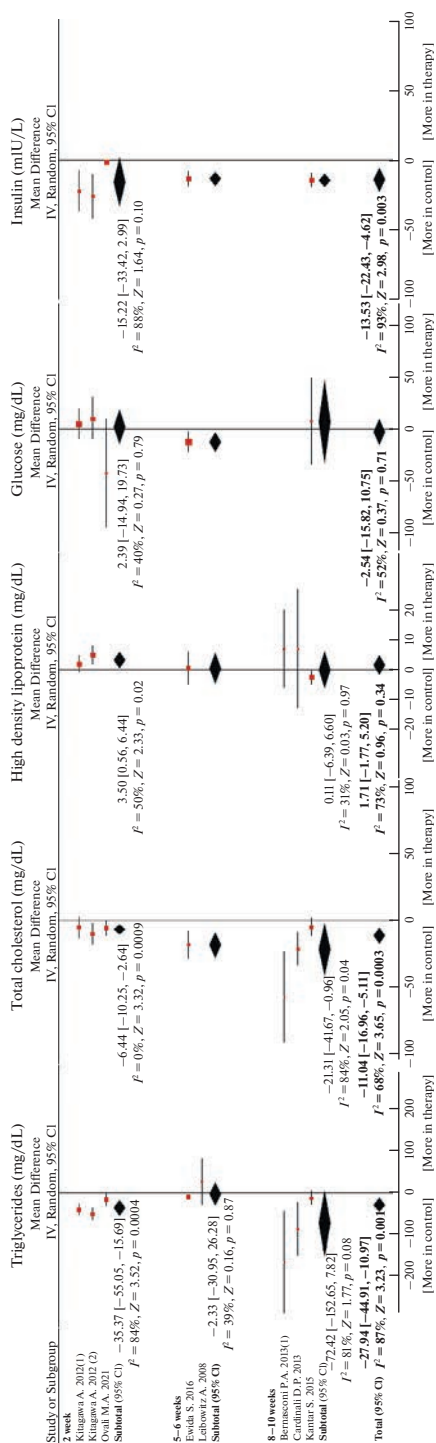
мелатонин, введенный орально [16] или подкожно [30] в дозе 10 мг/кг/день, не изменял уровень ОХ и ЛВП, но при подкожном введении снижал уровень триглицеридов. 8-недельный оральный прием мелатонина в дозе 10 мг/кг/день не изменял или слегка повышал уровень глюкозы [35, 64, 67], а внутрибрюшинное 8-недельное введение мелатонина слегка снижало уровень глюкозы [53].

Прием мелатонина в светлую фазу способствовал увеличению уровня глюкозы и ЛВП, перед темной фазой или в темную фазу — снижал уровень триглицеридов (рис. 3). Однако при проведении этого метаанализа мы не учитывали продолжительность терапии, дозу и способ введения. При сравнении отдельных исследований, в которых использовались одинаковая доза (около 1 мг/кг/день), способ (внутрибрюшинное) и продолжительность (8 нед.) введения, при утреннем введении мелатонин незначительно повышал уровень глюкозы, а при вечернем — наблюдалось существенное снижение [28, 46].

В нашей работе мы не исследовали влияния возраста животных на эффект мелатонина ввиду того, что было мало работ с использованием возрастных крыс, большинство исследователей проводили эксперименты на 1.5–3-месячных крысах. Однако установлено, что старение ассоциировано с ухудшением показателей липидного профиля и толерантности к глюкозе [68, 69]. Интересно отметить, что прием мелатонина в течение 5–16 нед. снижал уровень триглицеридов, но не ОХ у крыс 5–12-месячного возраста, содержащихся на стандартной диете [21, 23, 44]. Причем мелатонин (в дозе 0.5 мг/кг/день, 12 нед.) лучше снижал триглицериды и глюкозу у самок, а инсулин — у самцов [23]. Снижение уровня глюкозы у 3-месячных самок наблюдал и Chuffa с соавт. [28] после 8-недельной терапии мелатонином в дозе 1 мг/кг/день. Однако по сообщениям Mustonen с соавт. [48] при стандартном освещении и диете 4 недельная терапия мелатонином в дозе 2 мг/кг/день незначительно увеличивала уровень глюкозы у 2-месячных самцов и самок, а уровень инсулина — только у самцов.

#### *Диета, обогащенная фруктозой*

Всего было отобрано 7 публикаций, изучающих влияние терапии мелатонином на показатели липидного и углеводного обмена у крыс, содержащихся на диете, обогащенной фруктозой. Фруктоза в разных концентрациях добавлялась либо в питьевую воду, либо в корм. Во всех работах, кроме двух, введение фруктозы и мелатонина начиналось одновременно. В 2 исследованиях [40, 52] добавление фруктозы в диету начиналось за 4 и 8 нед. до начала терапии и продолжалась во время терапии. В 7 работах исследовалось влияние введения мелатонина на уровень циркулирующих триглицеридов, в 6 работах — на уровень ОХ, в 5 работах — на уровень ЛВП, в 4 работах — на уровень глюкозы и инсулина (табл. S). У крыс, содержащихся на диете, обогащенной фруктозой, средний уровень триглицеридов был  $164 \pm 115$  мг/дл, ОХ —  $89 \pm 31$  мг/дл, ЛВП —  $34 \pm 26$  мг/дл, глюкозы —  $190 \pm 58$  мг/дл, инсулина —  $34 \pm 19$  мМЕ/л. Терапия мелатонином в дозе 1–30 мг/кг/день продолжалась в течение 2–10 нед. и снижала уровень циркулирующих триглицеридов, ОХ и инсулина. Наблюдалась тенденция увеличения ЛВП при приеме мелатонина (рис. 4). Эффект терапии был замечен уже через 2 нед. после начала. Концентрация глюкозы существенно не изменялась при приеме мелатонина на данной диете (рис. 4). Эффект терапии был незначительно лучше при более низких дозах мелатонина (рис. 3). Внутрибрюшинное введение увеличивало уровень ЛВП, для других параметров не удалось установить зависимость от способа введения (рис. 3). Мы не смогли оценить зависимость эффекта терапии от времени введения мелатонина, поскольку во многих работах время введения не было указано.



**Рис. 4.** Влияние терапии мелатонином на показатели липидного профиля, глюкозу и инсулин у крыс, содержащихся на диете, обогащенной фруктозой.  $I^2$  – гетерогенность,  $Z$  – суммарный эффект,  $p$  – значимость эффекта. Метаанализ проведен без стандартизации по дозе, способу и времени введения.

*Диета, обогащенная жирами*

Всего было отобрано 11 публикаций, изучающих влияние терапии мелатонином на показатели липидного и углеводного обмена у крыс, содержащихся на диете, обогащенной различными пищевыми жирами. В 9 исследованиях [22, 38, 49–51, 55, 57, 62, 66] высокожировая диета и терапия мелатонином начинались одновременно, в 2 исследованиях [63, 65] высокожировая диета начиналась за 4 и 8 недель до начала терапии и продолжалась во время терапии. В 9 работах исследовалось влияние введения мелатонина на уровень циркулирующих триглицеридов, в 8 работах — на уровень ОХ, в 6 работах — на уровень ЛВП, в 7 работах — на уровень глюкозы, в 6 работах — на уровень инсулина (табл. S). У крыс, содержащихся на диете, обогащенной жирами, средний уровень триглицеридов был  $135 \pm 101$  мг/дл, ОХ —  $129 \pm 45$  мг/дл, ЛВП —  $24 \pm 16$  мг/дл, глюкозы —  $109 \pm 31$  мг/дл, инсулина —  $63 \pm 74$  мМЕ/л. Терапия мелатонином в дозе 1–50 мг/кг/день продолжалась в течение 2–16 нед. Мелатонин существенно снижал уровень триглицеридов и ОХ у крыс, содержащихся на жирной диете (рис. 5). Также наблюдалась тенденция снижения уровня глюкозы и инсулина (рис. 5). Данные по влиянию терапии на уровень ЛВП очень противоречивы (рис. 5). Результаты включенных в метаанализ работ показали, что при более низких дозах мелатонин увеличивал уровень ЛВП, при высоких дозах — незначительно уменьшал (рис. 3). На другие параметры доза не оказывала существенного влияния (рис. 3). Зависимость эффекта терапии от способа и времени введения мы не смогли оценить из-за недостаточного количества публикаций.

*Диета, обогащенная холестерином*

Всего было отобрано 5 публикаций, изучающих влияние терапии мелатонином на показатели липидного и углеводного обмена у крыс, содержащихся на диете, обогащенной холестерином. Холестерин (1–2%) вместе с холевой кислотой (0.2–0.5%) добавлялся в стандартный корм. В 5 работах высокохолестериновая диета и терапия мелатонином начинались одновременно, в 1 работе наряду с одновременным введением было исследовано введение мелатонина через 2 нед. высокохолестериновой диеты [60]. В 4 работах исследовалось влияние введения мелатонина на уровень циркулирующих триглицеридов, в 5 работах — на уровень ОХ, в 3 работах — на уровень ЛВП, в 3 работах — на уровень глюкозы (табл. S). У крыс, содержащихся на диете, обогащенной холестерином, средний уровень триглицеридов был  $65 \pm 21$  мг/дл, ОХ —  $165 \pm 43$  мг/дл, ЛВП —  $17 \pm 11$  мг/дл, глюкозы —  $108 \pm 11$  мг/дл. Терапия мелатонином в дозе 0.3–17 мг/кг/день продолжалась в течение 2–12 нед. Мелатонин значимо снижал уровень ОХ и увеличивал уровень ЛВП, но не оказывал влияния на концентрацию триглицеридов (рис. 6). Также наблюдалась тенденция увеличения уровня глюкозы на фоне терапии (рис. 6). Не было установлено зависимости эффекта от дозы (рис. 3). Работ, исследующих влияния введения мелатонина на уровень инсулина при данной диете, не было найдено. Во всех работах, кроме одной [34], мелатонин вводился внутривентрально. Зависимость эффекта терапии от времени введения мы также не смогли оценить из-за недостаточного количества публикаций.

По результатам нашего метаанализа, терапия мелатонином максимально снижала уровень триглицеридов и инсулина у крыс, находящихся на диете с добавлением фруктозы, а уровень ОХ — у крыс, содержащихся на диете, обогащенной жирами и холестерином. Эффект терапии на уровень ЛВП был максимально выражен на диете, обогащенной холестерином. В табл. 2 отображены суммарные эффекты монотерапии мелатонином на показатели липидного и углеводного обмена при различных диетах.

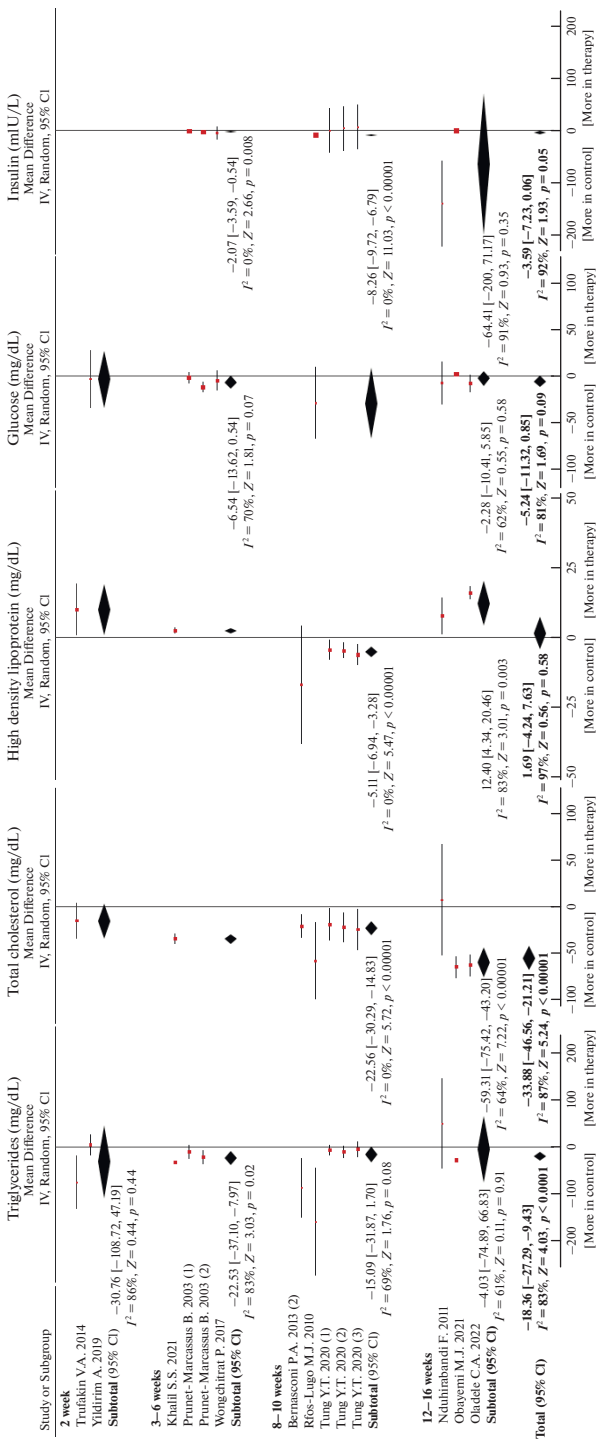


Рис. 5. Влияние терапии мелатонином на показатели липидного профиля, глюкозу и инсулин у крыс, содержащихся на диете, обогащенной жирами.  $I^2$  – гетерогенность,  $Z$  – суммарный эффект,  $p$  – значимость эффекта. Метаанализ проведен без стандартизации по дозе, способу и времени введения.

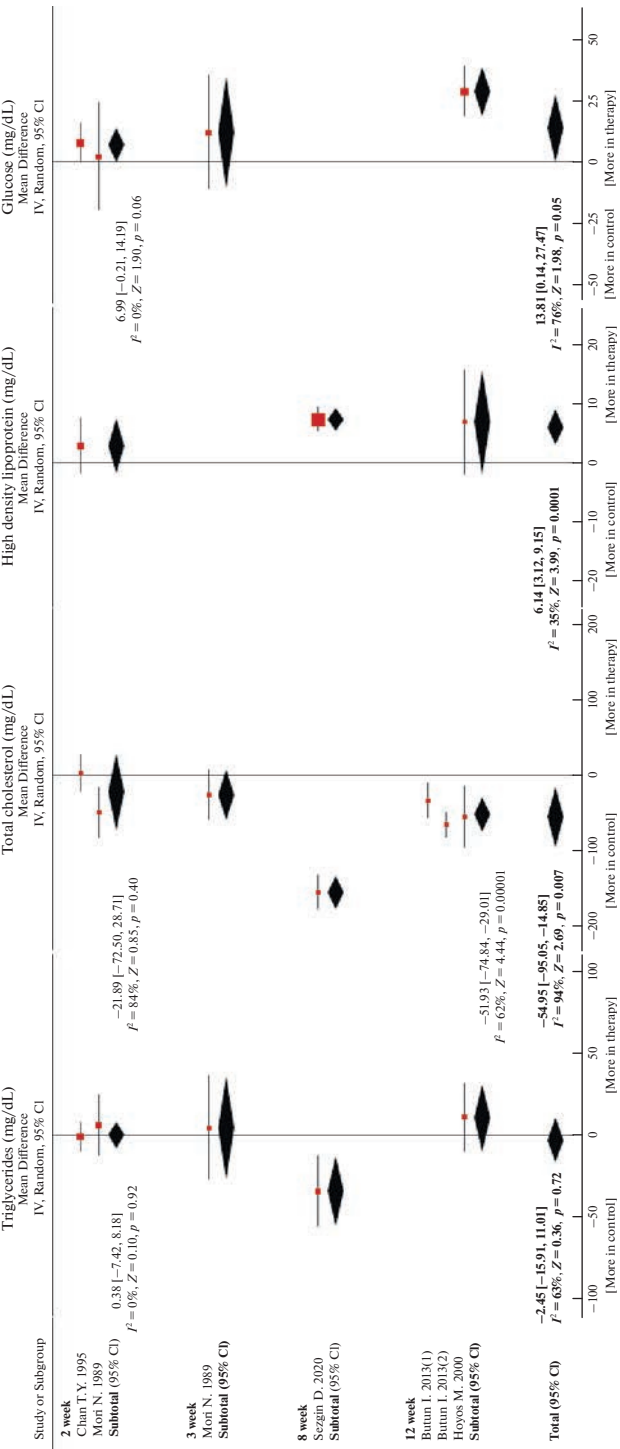


Рис. 6. Влияние терапии мелатонином на показатели липидного профиля и глюкозу у крыс, содержащихся на диете, обогащенной холестерином.  $I^2$  – гетерогенность,  $Z$  – суммарный эффект,  $p$  – значимость эффекта. Метаанализ проведен без стандартизации по дозе, способу и времени введения.

**Таблица 2.** Зависимость от диеты эффекта мелатонина на показатели липидного и углеводного обмена

| Параметры                      | Стандартная диета        | Диета, обогащенная фруктозой | Диета, обогащенная жирами | Диета, обогащенная холестерином |
|--------------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Триглицериды                   | б/и или ↑<br>* # ^ \$    | ↓                            | ↓                         | б/и                             |
| Общий холестерин               | б/и                      | ↓                            | ↓                         | ↓                               |
| Липопротеины высокой плотности | б/и или ↑<br>* ^ \$      | б/и или ↑<br>^               | ↓ или ↑<br>*              | ↑                               |
| Глюкоза                        | б/и или ↑<br>* # \$      | б/и                          | б/и                       | ↑ или б/и                       |
| Инсулин                        | б/и или ↑ или ↓<br>* # ^ | ↓                            | ↓ или б/и                 | —                               |

б/и — без изменений, ↑ — увеличение, ↓ — уменьшение, \* — зависимость эффекта от дозы, # — зависимость эффекта от продолжительности терапии, ^ — зависимость эффекта от способа введения, \$ — зависимость эффекта от времени введения, (—) — нет информации.

Следует отметить, что мы не исследовали в нашем метаанализе влияние терапии мелатонином на липопротеины низкой плотности (ЛНП) из-за разной методики оценки в разных публикациях (показатели ЛНП могли включать, а могли и не включать липопротеины очень низкой плотности), что привело к очень большому разбросу значений ЛНП даже у крыс, находящихся на стандартной диете (от 7 до 126 мг/дл). Однако то, что у крыс, находящихся на диете с добавлением фруктозы, жиров и холестерина, терапия мелатонином вызывала снижение ОХ без изменения или с увеличением ЛВП, свидетельствует о том, что снижение ОХ происходило, главным образом, за счет уменьшения концентрации ЛНП. Об этом также свидетельствуют и опубликованные результаты исследований [22, 24, 26, 31, 34, 37, 38, 51, 60, 63].

При анализе диет мы не учитывали точный состав диет и время начала диеты (до или одновременно с терапией мелатонином), поскольку было мало работ, в которых диета предшествовала терапии и продолжалась далее вместе с терапией. Но исследование высокохолестериновой диеты показало, что мелатонин был эффективен в любом случае [60].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный нами метаанализ показал, что у крыс, содержащихся на стандартной диете, мелатонин значимо снижал уровень инсулина (9–11 нед.) и увеличивал концентрацию глюкозы в крови (2–6 нед.), а при дозе  $\geq 10$  мг/кг/день также вызывал повышение уровня циркулирующих триглицеридов и инсулина в начале терапии (2 нед.). Эффект мелатонина на концентрацию ОХ не зависел от дозы у крыс, содержащихся на стандартной диете, однако через 8 нед. терапии мелатонин в дозе  $\leq 1$  мг/кг/день вызывал увеличение ЛВП, а в дозе  $\geq 10$  мг/кг/день, наоборот, незначительное уменьшение ЛВП. Интересно отметить, что в работах, где одновременно исследовались разные дозы мелатонина при стандартной диете, не был зафиксирован существенный эффект дозы на параметры липидного профиля, но наблюдалось незначительное увеличение уровня глюкозы при более высоких дозах при терапии 2 и 6, но не 8 нед. [40, 46, 58].

Диета, обогащенная фруктозой, вызывала у крыс существенное повышение уровня триглицеридов, глюкозы и инсулина. Известно, что при метаболизме фруктозы наряду с глюкозой образуется глицерол, из которого и синтезируются триглицериды [70]. У крыс, находящихся на диете, обогащенной жирами, наблюдалось

увеличение уровня триглицеридов, ОХ, инсулина и снижение концентрации ЛВП. Жирная диета, по сравнению с диетой с добавлением фруктозы, вызывала изменение триглицеридов в меньшей степени, а инсулина и ОХ — в большей. У крыс, содержащихся на диете, обогащенной холестерином, наблюдалось увеличение уровня ОХ и снижение концентрации ЛВП без увеличения уровня триглицеридов. По результатам метаанализа при диетах с повышенным содержанием фруктозы и жира терапия мелатонином снижала концентрацию триглицеридов, ОХ и инсулина; а при диете, обогащенной холестерином, мелатонин снижал уровень ОХ и повышал уровень ЛВП, но не изменял концентрацию триглицеридов. При этом уровень триглицеридов и инсулина максимально снижался мелатонином у крыс, находящихся на диете с добавлением фруктозы, а уровень ОХ — у крыс, содержащихся на диете, обогащенной жирами и холестерином. В работе [63] после 8-недельного введения мелатонина крысам, содержащимся на жирной диете, наблюдали увеличение фекального холестерина, как предполагают, за счет стимуляции секреции холестерина желчи и снижения поглощения холестерина в кишечнике. После терапии мелатонином уровень глюкозы оставался без существенных изменений при диетах с добавлением фруктозы и жиров, но увеличивался при диете, обогащенной холестерином. Мы не выявили положительного эффекта увеличения дозы мелатонина на показатели липидного и углеводного обмена ни при одной из исследованных диет. Однако отдельные работы показали незначительное усиление положительного эффекта терапии на уровень ОХ с увеличением дозы мелатонина у крыс, содержащихся на диетах, обогащенных фруктозой, жирами и холестерином [24, 40, 63]. Поскольку эффект терапии зависел от диеты, это подтверждает гомеостатическую роль мелатонина в метаболизме липидов.

Вероятно, способ введения мелатонина также мог оказать влияние на эффект мелатонина по причине различий в биодоступности, периоде до достижения максимальной концентрации и выведения. Так, при стандартной диете уровень триглицеридов максимально повышался при внутрибрюшинном введении, глюкозы — при введениях внутрибрюшинном или через желудочный зонд. Инсулин максимально снижался при введении с питьевой водой, когда поступление мелатонина в организм растянуто во времени. У крыс, содержащихся на стандартной диете и диете, обогащенной фруктозой, внутрибрюшинное и подкожное введение мелатонина повышало уровень ЛВП. Показано, что внутрибрюшинное и подкожное введение препаратов по сравнению с оральным введением ассоциировано с большей биодоступностью и с более коротким временем достижения максимальных плазменных концентраций [71, 72]. В то же время, по результатам нашего метаанализа, при всех диетах снижение ЛВП было ассоциировано с низкими дозами мелатонина. Кроме того (без учета дозы и продолжительности терапии), при стандартной диете введение мелатонина в светлую фазу способствовало повышению уровня глюкозы и ЛВП, а в темную фазу — способствовало снижению уровня триглицеридов. По результатам работы [55] у крыс, содержащихся на жирной диете, амплитуда снижения уровня триглицеридов и инсулина была незначительно больше при вечернем приеме мелатонина, чем при утреннем, но эффект на уровень глюкозы не зависел от времени приема. Здесь, вероятно, играет роль усиление или ослабление экзогенным мелатонином циркадных изменений метаболизма. Интересно отметить, что введение мелатонина перед темной фазой сильнее смещало циркадный профиль глюкозы, чем введение мелатонина непосредственно в темную фазу [57, 58].

В основе влияния мелатонина на метаболизм большую роль, вероятно, играет то, что он модулирует уровень инсулина и чувствительность к нему. Известно, что инсулин является одним из главных гормонов обмена веществ. Основные эффекты инсулина на углеводно-липидный обмен состоят в: утилизации глюкозы тканями, накоплении гликогена, в синтезе жирных кислот и подавлении липолиза [73, 74].

Инсулинорезистентность сопровождается снижением чувствительности клеток к инсулину, что приводит к увеличению уровня циркулирующих липидов, глюкозы и инсулина, а также к ухудшению липидного профиля за счет увеличения ЛНП и уменьшения ЛВП [74]. Повышенное употребление фруктозы и жиров ассоциировано с развитием инсулинорезистентности [70, 74]. В экспериментах мелатонин не изменял толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину при стандартной диете, но уменьшал инсулинорезистентность при диете, обогащенной жирами или фруктозой [40, 51]. У крыс, содержащихся на стандартной диете, мелатонин не изменял экспрессии инсулиновых рецепторов в гепатоцитах и поджелудочной железе [33, 54], но увеличивал их экспрессию в шишковидной железе [54]. Кроме того, после 10-недельной терапии мелатонином снижение экспрессии инсулиновых рецепторов в гипоталамусе наблюдалось и при стандартной, и при жирной диете, но эффект при жирной диете был выражен сильнее [75]. Поскольку, по результатам нашего метаанализа, длительная терапия мелатонином вызывала снижения уровня инсулина, триглицеридов и ОХ, но при этом увеличивала или не изменяла концентрацию глюкозы в крови, можно предположить, что продолжительный прием мелатонина уменьшает синтез инсулина.

Результаты экспериментов, исследующих влияние мелатонина на обмен глюкозы, очень противоречивы. Так, в экспериментах *in vitro* наблюдали увеличение секреции соматостатина (гормона, ингибирующего инсулин) в культуре клеток островков поджелудочной железы человека после обработки мелатонином [76]. Однако прием мелатонина вызывал снижение уровня соматостатина в крови у людей и грызунов [77, 78]. В экспериментах наблюдали повышение уровня глюкозы, инсулина, ОХ и ЛВП через 30–60 мин после однократного периферического введения мелатонина [79, 80]. При этом интрацеребровентрикулярная инъекция мелатонина подавляла глюконеогенез в печени крыс [81]. Ряд исследований показал увеличение уровня глюкозы при дефиците мелатонина, вызванном пинеалэктомией или постоянным освещением [10, 82, 83].

Эффекты мелатонина на уровень инсулина реализуются через мембранные МТ- (MT1 и MT2) рецепторы, сопряженные с G-белками. Рецепторы MT1 и MT2 проявляют разную чувствительность к физиологическим (30–400 пМ) и супрафизиологическим (1–1000 нМ) концентрациями мелатонина [84]. К числу эффекторных систем, которые активируются мелатонином, относятся аденилатциклаза, фосфолипаза С, фосфолипаза А2, калиевые каналы, гуанилатциклаза, кальциевые каналы. В желудочно-кишечном тракте, в том числе в поджелудочной железе и в печени, экспрессируют как MT1-, так и MT2-рецепторы [84, 85]. Причем плотность MT1- и MT2-рецепторов в поджелудочной железе самая высокая в бета-клетках у недиабетических пациентов и в дельта-клетках у пациентов с диабетом [84]. С одной стороны, мелатонин ингибирует секрецию инсулина бета-клетками, подавляя через MT1- и MT2-рецепторы путь аденилатциклазы, а также через MT2-рецепторы путь гуанилатциклазы. С другой стороны, мелатонин может также стимулировать секрецию инсулина через MT2-рецепторы за счет высвобождения инозитолтрифосфата. Кроме того, мелатонин может модулировать реакцию инсулина на глюкагоноподобный пептид 1, глюконеогенез, секрецию глюкагона и соматостатина, чувствительность печени к инсулину, активность липопротеиновой липазы, механизмы регуляции гипоталамус–печень [6, 84]. Установлено, что линии мышей с генетической делецией MT1- и MT1/MT2-рецепторов демонстрируют повышенный уровень инсулина в старом возрасте [86]; а риск диабета у людей был ассоциирован с повышенной экспрессией МТ-рецепторов в островках поджелудочной железы [87] и с определенными вариантами *MTNR1B* гена [84]. Мутация в гене *GPR50* (сиротский рецептор, который структурно схож с рецепторами мелатонина без способности связывать мелатонин) ассоциирована с повышенным уровнем триг-

лицидеридов и снижением ЛВП [88]. У мышей с нокаутом *GPR50* наблюдались уменьшение прироста массы тела и жира при высококалорийной диете, но меньшие потери массы при голодании [89]. Экспрессия МТ-рецепторов связана с циркадным циклом, а экспрессия *GPR50* чувствительна не только к изменениям фотопериода, но и к энергетическому статусу, уровню лептина и диете [88–90]. В экспериментах у мышей экспрессия *GPR50* в головном мозге (в эпендиме третьего желудочка и в дорсомедиальных ядрах гипоталамуса) снижалась как при голодании, так и при высококалорийной диете [89]. Известно, что МТ1-, МТ2- и GPCR-рецепторы могут образовывать гетеродимеры, причем *GPR50* угнетает аффинность МТ1-рецепторов, но не МТ2 [88]. Можно предположить, что зависимость физиологических эффектов мелатонина от дозы и диеты объясняется разной чувствительностью типов МТ-рецепторов к мелатонину и изменением их экспрессии при различных диетах.

Было установлено, что мелатонин влияет на экспрессию многих генов, участвующих в гомеостазе холестерина, глюконеогенезе, липидном обмене, чувствительности к инсулину, антиоксидантных эффектах (*Abc*, *Acs13*, *Aldh3a2*, *Dhodh*, *Gpi*, *Gpi2*, *PGC1α*, *PPARα*, *PPARγ*, *NRF*, *SIRT1*, *C/EBP* и др.) [6, 64, 91]. В экспериментах при повышенном потреблении фруктозы и жира наблюдали изменения экспрессии этих генов, а также циркадных генов, которые могли быть нивелированы введением мелатонина [57, 64, 91, 92]. Есть гипотеза, что мелатонин может реализовывать свои эффекты не только через мембранные МТ-рецепторы, но также через связанные с ретиноевой кислотой ядерные ROR-рецепторы. Предполагают, что мелатонин является лигандом средней аффинности для ROR, при этом лигандами высокой аффинности для ROR является холестерин и стероиды [93]. Кроме того, некоторые авторы допускают модуляцию мелатонином экспрессии генов посредством метилирования ДНК [6].

Мелатонин может оказывать влияние на показатели липидного и углеводного обмена через модуляцию аппетита и пищевого поведения. Есть наблюдения изменения под действием мелатонина экспрессии генов *POMC*, *NPY*, *leptin-R* (участвуют в регуляции аппетита) в гипоталамусе [75], а также уменьшения концентрации лептина у крыс, содержащихся на жирной диете [49, 55, 57]. Однако длительный прием мелатонина по результатам одних работ не вызывал у крыс независимо от диеты существенного изменения количества потребляемой пищи [23, 29, 37, 48, 61, 63], по результатам других — увеличивал [50] или уменьшал [28, 45].

Известно, что в природе снижение метаболизма зимой у позвоночных животных связано с угнетением под действием мелатонина секреции тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ), что в итоге приводит к уменьшению экспрессии гена *DIO2* (с активацией *DIO3*) и секреции активного трийодтиронина (Т3) [8]. Содержание крыс в условиях короткого дня сопровождалось увеличением уровня мелатонина и уменьшением концентрации циркулирующих тироксина и Т3 [94]. Гормоны щитовидной железы участвуют как в глюконеогенезе, так и в гликогенолизе, как в липогенезе, так и в липолизе. Кроме того, установлено, что Т3 необходим для перехода клеток островков поджелудочной железы в чувствительные к глюкозе клетки, секретирующие инсулин [95]. В экспериментах наблюдали у крыс после внутривенного введения мелатонина дозозависимое снижение уровня ТТГ в плазме [96], а прием мелатонина (в дозе 3–10 мг/кг/день) в течение 1–5 нед. существенно снижал уровень тиреоидных гормонов [17, 21, 97, 98]. Однако к 8 нед. терапии (мелатонин в дозе 1–10 мг/кг/день) активность гормонов щитовидной железы, по-видимому, нормализовывалась или даже увеличивалась [64, 99, 100]. С другой стороны, терапия в дозе 10 мг/л (1.5 мг/кг/день) продолжительностью 32 нед. и более также была ассоциирована с уменьшением ТТГ и свободного Т3 [100]. В ряде работ были

обнаружены изменения уровней ТТГ и тиреоидных гормонов у крыс, содержащихся на диетах с повышенным содержанием фруктозы и жира [101–104].

Мелатонин также оказывает влияние на метаболизм через свои антиоксидантные свойства. Есть сообщения, что секреция инсулина может ингибироваться мелатонином посредством снижения уровня активных форм кислорода в островках поджелудочной железы [105]. Диеты с повышенным содержанием фруктозы, жиров и холестерина ассоциированы с угнетением антиоксидантных ферментативных систем и с увеличением окислительного стресса [31, 40, 50, 51, 60, 70, 91, 106]. Известно, что при фруктолизе и липолизе вырабатываются первичные метаболиты (свободные жирные кислоты, желчные кислоты, мочевая кислота, лактат), повышение концентраций которых вызывает увеличение активных форм кислорода [70, 106]. Прием мелатонина может ослабить окислительный стресс благодаря своим антиоксидантным свойствам и способности снижать уровень вредных метаболитов [9, 26, 34]. В экспериментах терапия мелатонином снижала концентрацию мочевой кислоты и малонового диальдегида (индикатора окислительного стресса) в крови, при этом повышая концентрацию ферментов, защищающих от окислительного повреждения. Кроме того, мелатонин улучшал функционирование митохондрий, которое было существенно нарушено при метаболическом синдроме [9]. Антиоксидантный эффект мелатонина был сильнее выражен у крыс, содержащихся на диетах с повышенным содержанием фруктозы, жиров и холестерина по сравнению с животными, потребляющими стандартную диету [31, 34, 40, 50, 51, 60].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В итоге, наш метаанализ показал, что длительная монотерапия мелатонином улучшает показатели липидного профиля (снижает уровень триглицеридов и ОХ в основном за счет снижения уровня ЛНП) у крыс, содержащихся на диетах, обогащенных фруктозой, жирами и холестерином. Это делает возможным использование мелатонина для профилактики и лечения метаболических нарушений, сопровождающихся гиперлипидемией. Следует учесть, что мелатонин может несколько повышать уровень глюкозы в крови. Однако этот эффект был выражен на стандартной диете и на диете, обогащенной холестерином, но не на диетах с повышенным содержанием фруктозы и жира. Некоторые исследователи установили, что это побочное действие мелатонина существенно уменьшается, если прием пищи и прием мелатонина разделены во времени [87]. Как показал наш метаанализ, у крыс, содержащихся на стандартной диете, ухудшение показателей углеводного обмена при терапии было ассоциировано с более высокими дозами мелатонина в начале терапии, с внутрибрюшинным введением или с введением через желудочный зонд, с введением в светлую фазу. Однако следует учесть, что крысы, являясь ночными животными, основную часть корма и воды потребляют именно ночью. Кроме того, высокие дозы мелатонина были ассоциированы с ухудшением показателей липидного обмена при стандартной диете. Наш метаанализ не выявил положительного эффекта увеличения дозы мелатонина при диетах, обогащенных фруктозой, жирами и холестерином. Зависимость эффекта мелатонина от диеты подтверждает важную роль мелатонина в поддержании гомеостаза.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование осуществлялось из средств Государственного задания № 056-00119-22-00.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция — Н.В.К. и М.Г.П., подбор литературы и проведение метаанализа Н.В.К. и М.Г.П., написание текста — Н.В.К. и В.А.Ц, иллюстрации — Н.В.К.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mohammadi-Sartang M, Ghorbani M, Mazloom Z* (2018) Effects of melatonin supplementation on blood lipid concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr* 37 (6 Pt A): 1943–1954.  
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.11.003>
2. *Loloei S, Sepidarkish M, Heydarian A, Tahvilian N, Khazdouz M, Heshmati J, Pouraram H* (2019) The effect of melatonin supplementation on lipid profile and anthropometric indices: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Diabetes Metab Syndr* 13 (3): 1901–1910.  
<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.04.043>
3. *Lauritzen ES, Kampmann U, Smedegaard SB, Støy J* (2021) Effects of daily administration of melatonin before bedtime on fasting insulin, glucose and insulin sensitivity in healthy adults and patients with metabolic diseases. A systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 95 (5): 691–701.  
<https://doi.org/10.1111/cen.14576>
4. *Delpino FM, Figueiredo LM, Nunes BP* (2021) Effects of melatonin supplementation on diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Nutr* 40 (7): 4595–4605.  
<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.06.007>
5. *Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ* (2014) Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci* 71 (16): 2997–3025.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
6. *Karolczak K, Watala C* (2019) The Mystery behind the Pineal Gland: Melatonin Affects the Metabolism of Cholesterol. *Oxid Med Cell Longev* : 4531865.  
<https://doi.org/10.1155/2019/4531865>
7. *Guan Q, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y* (2021) Mechanisms of Melatonin in Obesity: A Review. *Int J Mol Sci* 23 (1): 218.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23010218>
8. *Dardente H, Wyse CA, Birnie MJ, Dupré SM, Loudon A.S, Lincoln GA, Hazlerigg DG* (2010) A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr Biol* 20 (24): 2193–2198.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.048>
9. *Chitimus DM, Popescu MR, Voiculescu SE, Panaitescu AM, Pavel B, Zagrean L, Zagrean AM* (2020) Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease. *Biomolecules* 10 (9): 1211.  
<https://doi.org/10.3390/biom1009121>
10. *Wang Y, Liu X, Wang W, Song W, Chen L, Fang Q, Yan X* (2013) The expression of inflammatory cytokines on the aorta endothelia are up-regulated in pinealectomized rats. *Inflammation* 36 (6): 1363–1373.  
<https://doi.org/10.1007/s10753-013-9676-1>
11. *Santos RMD, Marani F, Chiba FY, Mattera MSLC, Tsosura TVS, Tessarin GWL, Pereira RF, Belardi BE, Pinheiro BCES, Sumida DH* (2018) Melatonin promotes reduction in TNF levels and improves the lipid profile and insulin sensitivity in pinealectomized rats with periodontal disease. *Life Sci* 213: 32–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.056>
12. *McMullan CJ, Curhan GC, Schernhammer ES, Forman JP* (2013) Association of nocturnal melatonin secretion with insulin resistance in nondiabetic young women. *Am J Epidemiol* 178 (2): 231–238.  
<https://doi.org/10.1093/aje/kws470>

13. *McMullan CJ, Schernhammer ES, Rimm EB, Hu FB, Forman JP* (2013) Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes. *JAMA* 309 (13): 1388–1396.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.2710>
14. *Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR* (2009) Introduction to Meta-analysis. Wiley: Chichester.
15. *Abdulwahab DA, El-Missiry MA, Shabana S, Othman AI, Amer ME* (2021) Melatonin protects the heart and pancreas by improving glucose homeostasis, oxidative stress, inflammation and apoptosis in T2DM-induced rats. *Heliyon* 7 (3): e06474.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06474>
16. *Adeyemi WJ, Abdussalam TA, Abdulrahim A, Olayaki LA* (2020) Elevated, sustained, and yet reversible biotoxicity effects of lead on cessation of exposure: Melatonin is a potent therapeutic option. *Toxicol Ind Health* 36 (7): 477–486.  
<https://doi.org/10.1177/0748233720937199>
17. *Ahmed HH, Mannaa F, Elmegeed GA, Doss SH* (2005) Cardioprotective activity of melatonin and its novel synthesized derivatives on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Bioorg Med Chem* 13 (5): 1847–1457.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.066>
18. *Alqasim AA, Nour Eldin EEM, Hammadi SH, Esheba GE* (2020) Comparing the renoprotective effects of the antioxidants melatonin, vitamin D and vitamin E in diabetic rats. *J Taibah Univ Med Sci* 15 (5): 351–357.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2020.05.007>
19. *Aoyama H, Mori N, Mori W* (1987) Anti-glucocorticoid effects of melatonin on adult rats. *Acta Pathol Jpn* 37 (7): 1143–1148.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1987.tb00431.x>
20. *Aydin M, Oktar S, Ozkan OV, Alçin E, Oztürk OH, Nacar A* (2011) Letrozole induces hepatotoxicity without causing oxidative stress: the protective effect of melatonin. *Gynecol Endocrinol* 27 (4): 209–215.  
<https://doi.org/10.3109/09513590.2010.488769>
21. *Benova T, Viczenczova C, Radosinska J, Bacova B, Knezl V, Dosenko V, Weismann P, Zeman M, Navarova J, Tribulova N* (2013) Melatonin attenuates hypertension-related proarrhythmic myocardial maladaptation of connexin-43 and propensity of the heart to lethal arrhythmias. *Can J Physiol Pharmacol* 91 (8): 633–639.  
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0393>
22. *Bernasconi PA, Cardoso NP, Reynoso R, Scacchi P, Cardinali DP* (2013) Melatonin and diet-induced metabolic syndrome in rats: impact on the hypophysial-testicular axis. *Horm Mol Biol Clin Invest* 16 (2): 101–112.  
<https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0005>
23. *Bojková B, Orendás P, Friedmanová L, Kassayová M, Datelinka I, Ahlersová E, Ahlers I* (2008) Prolonged melatonin administration in 6-month-old Sprague-Dawley rats: metabolic alterations. *Acta Physiol Hung* 95 (1): 65–76.  
<https://doi.org/10.1556/APhysiol.95.2008.4>
24. *Butun I, Ekmekci H, Ciftci O, Sonmez H, Caner M, Altug T, Kokoglu E* (2013) The effects of different doses of melatonin on lipid peroxidation in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Bratisl Lek Listy* 114 (3): 129–132.  
[https://doi.org/10.4149/blil\\_2013\\_028](https://doi.org/10.4149/blil_2013_028)
25. *Cam M, Yavuz O, Guven A, Ercan F, Bukan N, Ustündag N* (2003) Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pineal Res* 35 (3): 212–220.  
<https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2003.00082.x>
26. *Cardinali DP, Bernasconi PA, Reynoso R, Toso CF, Scacchi P* (2013) Melatonin may curtail the metabolic syndrome: studies on initial and fully established fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Int J Mol Sci* 14 (2): 2502–2514.  
<https://doi.org/10.3390/ijms14022502>
27. *Chan TY, Tang PL* (1995) Effect of melatonin on the maintenance of cholesterol homeostasis in the rat. *Endocr Res* 21 (3): 681–696.  
<https://doi.org/10.1080/07435809509030483>
28. *Chuffa LG, Amorim JP, Teixeira GR, Mendes LO, Fioruci BA, Pinheiro PF, Seiva FR, Novelli EL, Mello Júnior W, Martinez M, Martinez FE* (2011) Long-term melatonin treatment reduces ovarian mass and enhances tissue antioxidant defenses during ovulation in the rat. *Braz J Med Biol Res* 44 (3): 217–223.  
<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500018>
29. *Djordjevic B, Cvetkovic T, Stoimenov TJ, Despotovic M, Zivanovic S, Basic J, Veljkovic A, Velickov A, Kocic G, Pavlovic D, Sokolovic D* (2018) Oral supplementation with melatonin reduces oxidative damage and concentrations of inducible nitric oxide synthase, VEGF and matrix metalloproteinase 9 in the retina of rats with streptozotocin/nicotinamide induced pre-diabetes. *Eur J Pharmacol* 833: 290–297.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.011>

30. *Ebaid H, Bashandy SA, Alhazza IM, Rady A, El-Shehry S* (2013) Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachloride-induced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats. *Nutr Metab (Lond)* 10 (1): 20.  
<https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-20>
31. *Ewida SF, Al-Sharakly DR* (2016) Implication of Renal Aquaporin-3 in Fructose-Induced Metabolic Syndrome and Melatonin Protection. *J Clin Diagn Res* 10 (4): CF06–CF11.  
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18362.7656>
32. *Görgün FM, Öztürk Z, Gümüştaş MK, Kökoku E* (2002) Melatonin administration affects plasma total sialic acid and lipid peroxidation levels in streptozotocin induced diabetic rats. *J Toxicol Environ Health A* 65 (10): 695–700.  
<https://doi.org/10.1080/00984100290071045>
33. *Hajam YA, Rai S* (2019) Melatonin and insulin modulates the cellular biochemistry, histoarchitecture and receptor expression during hepatic injury in diabetic rats. *Life Sci* 239:117046.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117046>
34. *Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R, Olivan J, Fabiani F, Garcia-Pergañeda A, Osuna C* (2000) Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Pineal Res* 28 (3): 150–155.  
<https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2001.280304.x>
35. *Kadry SM, El-Dakdoky MH, Haggag NZ, Rashed LA, Hassen MT* (2018) Melatonin improves the therapeutic role of mesenchymal stem cells in diabetic rats. *Toxicol Mech Methods* 28 (7): 529–538.  
<https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1471634>
36. *Kamsrijai U, Wongchitrat P, Nopparat C, Satayavivad J, Govitrapong P* (2020) Melatonin attenuates streptozotocin-induced Alzheimer-like features in hyperglycemic rats. *Neurochem Int* 132: 104601.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104601>
37. *Kantar Ş, Türközkan N, Bircan FS, Paşaoğlu ÖT* (2015) Beneficial effects of melatonin on serum nitric oxide, homocysteine, and ADMA levels in fructose-fed rats. *Pharm Biol* 53 (7): 1035–1041.  
<https://doi.org/10.3109/13880209.2014.957782>
38. *Khalil SS, Aziz JA, Ismail KA, El-Malkey NF* (2021) Comparative protective effects of N-acetylcysteine and melatonin against obesity-induced testicular dysfunction in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 99 (7): 708–719.  
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0499>
39. *Kim C, Kim N, Joo H, Youm JB, Park WS, Cuong DV, Park YS, Kim E, Min CK, Han J* (2005) Modulation by melatonin of the cardiotoxic and antitumor activities of adriamycin. *J Cardiovasc Pharmacol* 46 (2): 200–210.  
<https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000171750.97822.a2>
40. *Kitagawa A, Ohta Y, Ohashi K* (2012) Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. *J Pineal Res* 52 (4): 403–413.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00955.x>
41. *Korkmaz GG, Uzun H, Cakatay U, Aydin S* (2012) Melatonin ameliorates oxidative damage in hyperglycemia-induced liver injury. *Clin Invest Med* 35 (6): E370–E377.  
<https://doi.org/10.25011/cim.v35i6.19209>
42. *Leibowitz A, Peleg E, Sharabi Y, Shabtai Z, Shamiss A, Grossman E* (2008) The role of melatonin in the pathogenesis of hypertension in rats with metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 21 (3): 348–351.  
<https://doi.org/10.1038/ajh.2007.60>
43. *Li T, Ni L, Zhao Z, Liu X, Lai Z, Di X, Xie Z, Song X, Wang X, Zhang R, Liu C* (2018) Melatonin attenuates smoking-induced hyperglycemia via preserving insulin secretion and hepatic glycogen synthesis in rats. *J Pineal Res* 64 (4): e12475.  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12475>
44. *Mendes C, Lopes AM, do Amaral FG, Peliciari-Garcia RA, Turati Ade O, Hirabara SM, Scialfa Falcão JH, Cipolla-Neto J* (2013) Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. *J Pineal Res* 55 (3): 229–239.  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12065>
45. *Montano ME, Molpeceres V, Mauriz JL, Garzo E, Cruz IB, González P, Barrio JP* (2010) Effect of melatonin supplementation on food and water intake in streptozotocin-diabetic and non-diabetic male Wistar rats. *Nutr Hosp* 25 (6): 931–938.
46. *Montilla PL, Vargas JF, Túnez IF, Muñoz de Agueda MC, Valdeyira ME, Cabrera ES* (1998) Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 25 (2): 94–100.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1998.tb00545.x>
47. *Mori N, Aoyama H, Murase T, Mori W* (1989) Anti-hypercholesterolemic effect of melatonin in rats. *Acta Pathol Jpn* 39 (10): 613–618.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1989.tb02407.x>

48. *Mustonen AM, Nieminen P, Hyvärinen H* (2002) Effects of continuous light and melatonin treatment on energy metabolism of the rat. *J Endocrinol Invest* 25 (8): 716–723.  
<https://doi.org/10.1007/BF03345106>
49. *Nduhirabandi F, Du Toit EF, Blackhurst D, Marais D, Lochner A* (2011) Chronic melatonin consumption prevents obesity-related metabolic abnormalities and protects the heart against myocardial ischemia and reperfusion injury in a prediabetic model of diet-induced obesity. *J Pineal Res* 50 (2): 171–182.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00826.x>
50. *Obayemi MJ, Akintayo CO, Oniyide AA, Aturamu A, Badejogbin OC, Atuma CL, Saidi AO, Mahmud H, Olaniyi KS* (2021) Protective role of melatonin against adipose-hepatic metabolic comorbidities in experimentally induced obese rat model. *PLoS One* 16 (12): e0260546.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260546>
51. *Oladele CA, Akintayo CO, Badejogbin OC, Oniyide AA, Omoaghe AO, Agunbiade TB, Olaniyi KS* (2022) Melatonin ameliorates endocrine dysfunction and defective sperm integrity associated with high-fat diet-induced obesity in male Wistar rats. *Andrologia* 54 (1): e14242.  
<https://doi.org/10.1111/and.14242>
52. *Ovali MA, Oztopuz O, Vardar SA* (2021) Melatonin ameliorates cardiac remodelling in fructose-induced metabolic syndrome rat model by using genes encoding cardiac potassium ion channels. *Mol Biol Rep* 48 (8): 5811–5819.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06526-3>
53. *Paskaloglu K, Sener G, Ayanoğlu-Dülger G* (2004) Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol* 499 (3): 345–354.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.08.002>
54. *Peschke E, Schucht H, Mühlbauer E* (2010) Long-term enteral administration of melatonin reduces plasma insulin and increases expression of pineal insulin receptors in both Wistar and type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Pineal Res* 49 (4): 373–381.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00804.x>
55. *Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangé P, Renard P, Casteilla L, Pénicaud L* (2003) Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology* 144 (12): 5347–5352.  
<https://doi.org/10.1210/en.2003-0693>
56. *Rao MV, Purohit A, Patel T* (2010) Melatonin protection on mercury-exerted brain toxicity in the rat. *Drug Chem Toxicol* 33 (2): 209–216.  
<https://doi.org/10.3109/01480540903349258>
57. *Ríos-Lugo MJ, Cano P, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos MP, Scacchi PA, Cardinali DP, Esquifino AI* (2010) Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. *J Pineal Res* 49 (4): 342–348.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00798.x>
58. *Sankaran M, Subramanian P* (2006) Modulation of biochemical circadian rhythms during long-term melatonin treatment in rats. *Singapore Med J* 47 (1): 424–427.
59. *Sener G, Sehirli O, Yegen BC, Cetinel S, Gedik N, Sakarcan A* (2004) Melatonin attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats. *J Pineal Res* 37 (1): 17–25.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00131.x>
60. *Sezgin D, Aslan G, Sahin K, Tuzcu M, İlhan N, Sahna E* (2020) The effects of melatonin against atherosclerosis-induced endothelial dysfunction and inflammation in hypercholesterolemic rats. *Arch Physiol Biochem*: 1–8.  
<https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1838550>
61. *Terrón MP, Delgado-Adámez J, Pariente JA, Barriga C, Paredes SD, Rodríguez AB* (2013) Melatonin reduces body weight gain and increases nocturnal activity in male Wistar rats. *Physiol Behav* 118: 8–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.04.006>
62. *Труфакин ВА, Шурлыгина АВ, Душкин МИ, Храпова МВ, Мичурина СВ, Мельникова ЕВ, Пантелеева НГ, Тендитник МВ* (2014) Влияние мелатонина на клеточный состав селезенки и показатели липидного обмена у крыс с алиментарным ожирением. *Бюл экспер биол мед* 158 (7): 49–52. [*Trufakin VA, Shurlygina AV, Dushkin MI, Khrapova MV, Michurina SV, Mel'nikova EV, Panteleeva NG, Tenditnik MV* (2014) Effect of melatonin on cellular composition of the spleen and parameters of lipid metabolism in rats with alimentary obesity. *Bull Exp Biol Med* 158(7): 49–52. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.1007/s10517-014-2687-6>
63. *Tung YT, Chiang PC, Chen YL, Chien YW* (2020) Effects of Melatonin on Lipid Metabolism and Circulating Irisin in Sprague-Dawley Rats with Diet-Induced Obesity. *Molecules* 25 (15): 3329.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25153329>
64. *Wang L, McFadden JW, Yang G, Zhu H, Lian H, Fu T, Sun Y, Gao T, Li M* (2021) Effect of melatonin on visceral fat deposition, lipid metabolism and hepatic lipo-metabolic gene ex-

- pression in male rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 105 (4): 787–796.  
<https://doi.org/10.1111/jpn.13497>
65. *Wongchitrat P, Klosen P, Pannengpetch S, Kitidee K, Govitrapong P, Isarankura-Na-Ayudhya C* (2017) High-fat diet-induced plasma protein and liver changes in obese rats can be attenuated by melatonin supplementation. *Nutr Res* 42: 51–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.04.011>
  66. *Yildirim A, Arabacı Tamer S, Sahin D, Bagriacik F, Kahraman MM, Onur ND, Cayirli YB, Cilin-gir Kaya ÖT, Aksu B, Akdeniz E, Yuksel M, Çetinel Ş, Yeğen BÇ* (2019) The effects of antibiotics and melatonin on hepato-intestinal inflammation and gut microbial dysbiosis induced by a short-term high-fat diet consumption in rats. *Br J Nutr* 122 (8): 841–855.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114519001466>
  67. *Zaitone S, Hassan N, El-Orabi N, El-Awady el-S* (2011) Pentoxifylline and melatonin in combination with pioglitazone ameliorate experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Pharmacol* 662 (1-3): 70–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.049>
  68. *Quirós Cognuck S, Reis WL, Silva M, Debarba LK, Mecawi AS, de Paula FJA, Rodrigues Franci C, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J* (2020) Sex differences in body composition, metabolism-related hormones, and energy homeostasis during aging in Wistar rats. *Physiol Rep* 8 (20): e14597.  
<https://doi.org/10.14814/phy2.14597>
  69. *Boudet J, Rouillet JB, Lacour B* (1988) Influence of fast, body weight and diet on serum cholesterol, triglycerides, and phospholipids concentrations in the aging rat. *Horm Metab Res* 20 (12): 734–737.  
<https://doi.org/10.1055/s-2007-1010934>
  70. *Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD* (2017) High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients* 9 (4): 335.  
<https://doi.org/10.3390/nu9040335>
  71. *Al Shoyaib A, Archie SR, Karamyan VT* (2019) Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharm Res* 37(1): 12.  
<https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>
  72. *Zetner D, Andersen LP, Rosenberg J* (2016) Pharmacokinetics of Alternative Administration Routes of Melatonin: A Systematic Review. *Drug Res (Stuttg)* 66(4): 169–173.  
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1565083>
  73. *Petersen MC, Shulman GI* (2018) Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* 98 (4): 2133–2223.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
  74. *Lebovitz HE* (2001) Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 Suppl 2: S135–S148.  
<https://doi.org/10.1055/s-2001-18576>
  75. *Rios-Lugo MJ, Jiménez-Ortega V, Cano-Barquilla P, Mateos PF, Spinedi EJ, Cardinali DP, Es-quifino AI* (2015) Melatonin counteracts changes in hypothalamic gene expression of signals regulating feeding behavior in high-fat fed rats. *Horm Mol Biol Clin Invest* 21(3): 175–183.  
<https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0041>
  76. *Zibolka J, Mühlbauer E, Peschke E* (2015) Melatonin influences somatostatin secretion from human pancreatic  $\delta$ -cells via MT1 and MT2 receptors. *J Pineal Res* 58(2): 98–209.  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12206>
  77. *Nassar E, Mulligan C, Taylor L, Kerksick C, Galbreath M, Greenwood M, Kreider R, Willoughby DS* (2007) Effects of a single dose of N-Acetyl-5-methoxytryptamine (Melatonin) and resistance exercise on the growth hormone/IGF-1 axis in young males and females. *J Int Soc Sports Nutr* 4: 14.  
<https://doi.org/10.1186/1550-2783-4-14>
  78. *Cuesta S, Kireev R, García C, Rancan L, Vara E, Tresguerres JA* (2013) Melatonin can improve insulin resistance and aging-induced pancreas alterations in senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Age (Dordr)* 35 (3): 659–671.  
<https://doi.org/10.1007/s11357-012-9397-7>
  79. *Nijima A, Chun SJ, Shima T, Bizot-Espiard JG, Guardiola-Lemaitre B, Nagai K* (1998) Effect of intravenous administration of melatonin on the efferent activity of the adrenal nerve. *J Auton Nerv Syst* 71 (2-3): 134–138.  
[https://doi.org/10.1016/s0165-1838\(98\)00067-8](https://doi.org/10.1016/s0165-1838(98)00067-8)
  80. *Fabiś M, Pruszyńska E, Maćkowiak P* (2002) In vivo and in situ action of melatonin on insulin secretion and some metabolic implications in the rat. *Pancreas* 25 (2): 166–169.  
<https://doi.org/10.1097/00006676-200208000-00009>
  81. *Faria JA, Kinote A, Ignacio-Souza LM, de Araújo TM, Razolli DS, Doneda DL, Paschoal LB, Lellis-Santos C, Bertolini GL, Velloso LA, Bordin S, Anhê GF* (2013) Melatonin acts through MT1/MT2 receptors to activate hypothalamic Akt and suppress hepatic gluconeogenesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305 (2): E230–E242.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00094.2013>

82. *la Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, van der Vliet J, Buijs RM* (2001) Role for the pineal and melatonin in glucose homeostasis: pinealectomy increases night-time glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* 13 (12): 1025–1032.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2001.00717.x>
83. *Xing L, Wu S, Shi Y, Yue F, Wei L, Russell R, Zhang D* (2022) Chronic constant light exposure aggravates high fat diet-induced renal injury in rats. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 900392.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.900392>
84. *Nikolaev G, Robeva R, Konakchieva R* (2021) Membrane Melatonin Receptors Activated Cell Signaling in Physiology and Disease. *Int J Mol Sci* 23 (1): 471.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23010471>
85. *Mathes AM* (2010) Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World J Gastroenterol* 16 (48): 6087–6097.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i48.6087>
86. *Bazwinsky-Wutschke I, Bieseke L, Mühlbauer E, Peschke E* (2014) Influence of melatonin receptor signalling on parameters involved in blood glucose regulation. *J Pineal Res* 56 (1): 82–96.  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12100>
87. *Garaulet M, Qian J, Florez JC, Arendt J, Saxena R, Scheer FAJL* (2020) Melatonin Effects on Glucose Metabolism: Time To Unlock the Controversy. *Trends Endocrinol Metab* 31 (3): 192–204.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.11.011>
88. *Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrèze P* (2008) Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 154(6): 1182–1195.  
<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.184>
89. *Ivanova EA, Bechtold DA, Dupré SM, Brennand J, Barrett P, Luckman SM, Loudon AS* (2008) Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294 (1): E176–E182.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00199.2007>
90. *Bechtold DA, Sidibe A, Saer BR, Li J, Hand LE, Ivanova EA, Darras VM, Dam J, Jockers R, Luckman SM, Loudon AS* (2012) A role for the melatonin-related receptor GPR50 in leptin signaling, adaptive thermogenesis, and torpor. *Curr Biol* 22 (1): 70–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.043>
91. *Valenzuela-Melgarejo FJ, Caro-Díaz C, Cabello-Guzmán G* (2018) Potential Crosstalk between Fructose and Melatonin: A New Role of Melatonin-Inhibiting the Metabolic Effects of Fructose. *Int J Endocrinol*: 7515767.  
<https://doi.org/10.1155/2018/7515767>
92. *de Farias TDSM, Cruz MM, de Sa RCDC, Severi I, Perugini J, Senzacqua M, Cerutti SM, Giordano A, Cinti S, Alonso-Vale MI* (2019) Melatonin Supplementation Decreases Hypertrophic Obesity and Inflammation Induced by High-Fat Diet in Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10: 750.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00750>
93. *Ma H, Kang J, Fan W, He H, Huang F* (2021) ROR: Nuclear Receptor for Melatonin or Not? *Molecules* 26 (9): 2693.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26092693>
94. *Ostrowska Z, Kos-Kudła B, Marek B, Kajdaniuk D* (2003) Influence of lighting conditions on daily rhythm of bone metabolism in rats and possible involvement of melatonin and other hormones in this process. *Endocr Regul* 37(3): 163–174.
95. *Mullur R, Liu YY, Brent GA* (2014) Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev* 94 (2): 355–382.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2013>
96. *Mitsuma T, Nogimori T* (1985) Effects of various drugs on thyrotropin secretion in rats. *Horm Metab Res* 17 (7): 337–341.  
<https://doi.org/10.1055/s-2007-1013537>
97. *Baltacı AK, Mogulkoc R, Kul A, Bediz CS, Ugur A* (2004) Opposite effects of zinc and melatonin on thyroid hormones in rats. *Toxicology* 195 (1): 69–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.09.001>
98. *Ozturk G, Coşkun S, Erbaş D, Hasanoglu E* (2000) The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. *Jpn J Physiol* 50 (1): 149–153.  
<https://doi.org/10.2170/jjphysiol.50>
99. *Mirunalini S, Subramanian P* (2005) Temporal oscillations of thyroid hormones in long term melatonin treated rats. *Pharmazie* 60 (1): 52–56.
100. *Виноградова ИА* (2009) Влияние препаратов “мелатонин” и “эпиталон” на возрастную динамику тиреотропной активности гипофиза и функции щитовидной железы в разных световых режимах. *Успехи геронтолог* 22 (4): 631–638. [*Vinogradova IA* (2009) Effect of preparations melatonin and epitallon on the age-related dynamics of thyrotrophic activity of the hypophysis and thyroid gland function in different light regimes. *Adv Gerontol* 22(4):631–638. (In Russ)].

101. *Macdonald I* (1989) Some effects of various dietary carbohydrates on thyroid activity in the rat. *Ann Nutr Metab* 33 (1): 15–21.  
<https://doi.org/10.1159/000177516>
102. *El-Sayed SM, Ibrahim HM* (2020) Effect of high-fat diet-induced obesity on thyroid gland structure in female rats and the possible ameliorating effect of metformin therapy. *Folia Morphol (Warsz)* 79 (3): 476–488.  
<https://doi.org/10.5603/FM.a2019.0100>
103. *Shao SS, Zhao YF, Song YF, Xu C, Yang JM, Xuan SM, Yan HL, Yu CX, Zhao M, Xu J, Zhao JJ* (2014) Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats. *Acta Pharmacol Sin* 35(11): 1411–1420.  
<https://doi.org/10.1038/aps.2014.82>
104. *Araujo RL, Andrade BM, Padrón AS, Gaidhu MP, Perry RL, Carvalho DP, Ceddia RB* (2010) High-fat diet increases thyrotropin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and thyroxine in rats: the role of iodothyronine deiodinases, reverse T3 production, and whole-body fat oxidation. *Endocrinology* 151 (7): 3460–3469.  
<https://doi.org/10.1210/en.2010-0026>
105. *Simões D, Riva P, Peliciari-Garcia RA, Cruzat VF, Graciano MF, Munhoz AC, Taneda M, Cipolla-Neto J, Carpinelli AR* (2016) Melatonin modifies basal and stimulated insulin secretion via NADPH oxidase. *J Endocrinol* 231 (3): 235–244.  
<https://doi.org/10.1530/JOE-16-0259>
106. *Hauck AK, Huang Y, Hertzfel AV, Bernlohr DA* (2019) Adipose oxidative stress and protein carbonylation. *J Biol Chem* 294 (4): 1083–1088.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003214>

### Meta-Analysis of Experimental Studies of the Effect of Melatonin Monotherapy on the Level of Circulation Triglycerides, Cholesterol, Glucose and Insulin Depending on the Diet of Rats

N. V. Kuzmenko<sup>a, b, \*</sup>, V. A. Tsyrlin<sup>a</sup>, and M. G. Pliss<sup>a, b</sup>

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

<sup>b</sup>First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, Russia

\*e-mail: nat.kuzmencko2011@yandex.ru

It is known that melatonin modulates the daily and seasonal rhythms of metabolism. However, the effect of long-term intake of exogenous melatonin on the parameters of lipid and carbohydrate metabolism in various diets is still unclear. In our work, we conducted the meta-analysis of 53 publications investigating the effect of melatonin monotherapy on lipid and carbohydrate metabolism in rats kept on a standard diet (44 publications), as well as diets with a high content of fructose (7 publications), fats (11 publications) and cholesterol (5 publications). According to the literature, high fructose diet caused a significant increase in the levels of triglycerides, glucose and insulin in rats. In rats fed high fat diet, an increase in triglycerides, total cholesterol (TC), insulin, and a decrease in high-density lipoprotein (HDL) was observed. In rats kept on high cholesterol diet an increase in the level of TC and a decrease in the concentration of HDL was observed. Melatonin therapy reduced triglyceride, TC, and insulin levels but did not alter glucose levels in rats fed diets rich in fructose and fats. On a cholesterol-rich diet, melatonin decreased TC levels and increased HDL and glucose levels, but did not change triglyceride concentrations. Our meta-analysis found no beneficial effect of increasing the dose of melatonin with fortified diets. With a standard diet, long-term melatonin therapy also reduced insulin levels, but had no effect on TC and increased glucose levels. The deterioration in carbohydrate metabolism was associated with higher doses of melatonin at the beginning of therapy, with intraperitoneal administration or with administration through a gastric tube, with administration in the light phase. In addition, high doses of melatonin have been associated with poor lipid metabolism in the standard diet. The effect of melatonin was directed towards minimizing changes in the lipid profile caused by diet, which confirms the homeostatic role of melatonin in lipid metabolism.

**Keywords:** melatonin, fructose, fats, insulin, triglycerides, cholesterol, glucose

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**БЕЛОК YB-1 ПРЕДОТВРАЩАЕТ ВОЗРАСТНОЕ СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ  
ЭСТРАДИОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ  
У ТРАНСГЕННЫХ СТАРЕЮЩИХ САМОК МЫШЕЙ 5xFAD**

© 2023 г. Д. Ю. Жданова<sup>1</sup>, В. И. Ковалев<sup>1</sup>, А. В. Чаплыгина<sup>1</sup>,  
Н. В. Бобкова<sup>1</sup>, Р. А. Полтавцева<sup>2,\*</sup>, Г. Т. Сухих<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup>НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России,  
Москва, Россия

\*E-mail: rimpol@mail.ru

Поступила в редакцию 02.12.2022 г.

После доработки 20.12.2022 г.

Принята к публикации 26.12.2022 г.

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой неизлечимое нейродегенеративное заболевание, которое является основной причиной деменции в пожилом возрасте. При поиске новых методов лечения БА было обращено внимание на мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1). Ранее нами было выявлено положительное влияние интраназального введения YB-1 на обучение и пространственную память наряду со снижением содержания церебрального  $\beta$ -амилоида и интенсивности бляшкообразования, с улучшением выживаемости нейронов в коре и гиппокампе самцов мышей, моделирующих БА. Однако БА в 2 раза чаще развивается у женщин по сравнению с мужчинами, поэтому большой интерес представляет изучение эффектов YB-1 на стареющих самках. Эстрогены и андрогены необходимы для сохранения когнитивной функции в процессе старения и, по-видимому, могут препятствовать развитию БА. В данной работе изучали периферические уровни эстрадиола и цитокинов после интраназального введения YB-1 стареющим самкам трансгенных мышей 5xFAD и контрольным нетрансгенным животным. У интактных стареющих животных обеих групп выявлено нарушение эстрального цикла и снижение уровня эстрадиола в плазме крови. У мышей, которым вводили YB-1, не наблюдалось характерного возрастного снижения уровня эстрадиола в плазме. Введение YB-1 не влияло на периферический уровень цитокинов. Таким образом, показан новый, ранее не описанный эффект YB-1 на уровень эстрадиола в плазме у стареющих самок мышей. Эти данные указывают на то, что YB-1 может быть перспективным соединением в профилактике и лечении нейродегенеративных заболеваний. Тем не менее, необходимы дальнейшие эксперименты, чтобы получить представление о подробных механизмах действия YB-1.

**Ключевые слова:** эстрадиол, старение, YB-1, 5xFAD, интерлейкины

**DOI:** 10.31857/S0869813923020103, **EDN:** NEECQX

## ВВЕДЕНИЕ

Как известно, болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой неизлечимое нейродегенеративное заболевание, которое является основной причиной деменции в пожилом возрасте [1]. Специфический нейродегенеративный процесс, затрагива-

ющий структуры мозга, ответственные за память, приводит к развитию этого заболевания. При поиске новых методов лечения БА было обращено внимание на мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1 или YBX1). Белок YB-1 относится к семейству высококонсервативных белков с доменом холодового шока. Так, например, аминокислотная последовательность YB-1 человека и кролика отличается всего двумя синонимичными аминокислотными заменами (E24D, D293E). Этот ДНК- и РНК-связывающий белок участвует в целом ряде клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и ответ на стрессовые воздействия.

Связываясь с определенными нуклеотидными последовательностями в промоторах ряда важнейших генов, YB-1 позитивно или негативно влияет на их транскрипцию [2]. Кроме того, YB-1 обладает повышенным сродством к участкам ДНК с нарушенной вторичной структурой и способствует процессу репарации ДНК, ускоряя обмен комплементарных нуклеотидных последовательностей в двойных спиралах ДНК, он, как предполагается, может участвовать в рекомбинации ДНК [3]. YB-1 участвует в альтернативном сплайсинге предшественников мРНК в ядре, упаковывает молекулы мРНК в цитоплазме, определяет их функциональную активность, стабильность, а также локализацию транслирующихся мРНК на актиновом скелете [4]. YB-1 может секретироваться из клеток по неклассическому механизму [5], что предполагает возможность его внеклеточной активности, в частности в качестве лиганда рецептора Notch3 [6], чей сигнальный путь часто нарушается при нейродегенеративных патологиях. YB-1 участвует в регуляции клеточной пролиферации, поддержании статуса стволовых клеток и дифференцировке нейрональных предшественников [7]. YB-1 повышает стрессоустойчивость клеток и препятствует их преждевременному старению. YB-1 локализуется в клетках многих органов и тканей, а в головном мозге этот белок обнаружен в нейронах коры мозга и гиппокампа [8, 9], однако его количество резко уменьшается с возрастом. На двух экспериментальных моделях БА *in vivo* ранее нами было выявлено положительное влияние интраназального введения YB-1 на обучение и пространственную память наряду со снижением содержания церебрального  $\beta$ -амилоида и интенсивности амилоидогенеза, а также с улучшением выживаемости нейронов в коре и гиппокампе [10]. Все описанные свойства белка YB-1 демонстрируют его как перспективный объект при поиске средств лечения нейродегенеративных заболеваний, в том числе и БА.

Стоит отметить, что все ранее опубликованные нами данные о нейропротекторных свойствах белка YB-1 были получены при работе с самцами животных, хотя, как известно, БА в 2 раза чаще развивается у женщин по сравнению с мужчинами [11]. Поэтому исследование эффектов YB-1 на стареющих самках представляет большой интерес. В качестве одного из факторов риска БА, которое увеличивает возможность развития патологических нейродегенеративных процессов, деменции и БА у мужчин и женщин [11–16], мы рассматриваем возрастное снижение уровня половых стероидных гормонов, таких как тестостерона и эстрадиола (E2). После менопаузы у женщин относительно быстро падает уровень половых гормонов яичников, 17-бета-эстрадиола и прогестерона, что наблюдается как в крови, так и в головном мозге, при этом повышается подверженность нейронов нейродегенеративным изменениям [14, 15, 17]. У стареющих мужчин также происходит значительное снижение уровня циркулирующего тестостерона (явление, известное как дефицит андрогенов у стареющих мужчин), однако это не обязательно связано с потерей репродуктивной функции. Такие гормональные изменения происходят постепенно и, начиная с 30-летнего возраста, биодоступные уровни тестостерона снижаются на 2–3% ежегодно [17]. Истощение половых стероидных гормонов происходит вследствие нормального старения организма, при котором возрастает вероятность развития патологии в чувствительных к гормонам тканях, включая и мозг [15–19].

E2, основной женский половой стероидный гормон, синтезируется из холестерина в несколько стадий как в периферических тканях и в органах, в том числе в яичниках, семенниках, надпочечниках, печени, молочной железе, так и во многих областях мозга. Он взаимодействует с эстрогеновыми рецепторами (ER) ER $\alpha$ , ER $\beta$  и GPER1 [20–22]. Хорошо изучен прямой, так называемый классический, механизм передачи сигналов эстрогенов. В этом процессе эстрогеновые рецепторы ER $\alpha$  и ER $\beta$  выступают в качестве факторов транскрипции, активируемых лигандом. Эстроген, проникая через клеточную мембрану, образует комплекс с ядерными ER $\alpha$  и ER $\beta$  и перемещается к ядру, где взаимодействует с определенными участками ДНК и регулирует активность многих генов и, в итоге, синтез ряда белков. Негеномная активность эстрогенов опосредуется подмножеством классических мембранных ER, ER $\alpha$  и ER $\beta$ , связанных с двумя сигнальными путями. Эстрогеновый рецептор  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) передает сигнал через метаботропный глутаматный рецептор 1a (mGluR1a), который вызывает активацию Gq, PLC, IP3 и MAPK и, наконец, фосфорилирование фактора транскрипции CREB. Это позволяет предположить, что взаимодействие между ER и mGluR1a может иметь важное значение для улучшения памяти. Второй путь – активация, опосредованная кавеолином. Кавеолы представляют собой специализированные мембранные инвагинации, обогащенные каркасным белком кавеолином-1. Кавеолы облегчают передачу сигнала, предоставляя место для взаимодействия различных сигнальных молекул с их лигандами. Опосредованная кавеолином активация mGluR2/3 с помощью ER приводит к ингибированию Ca<sup>2+</sup>-каналов L-типа и блокаде протеинкиназы-A [23]. Мембранные ER также активируют мембранные тирозинкиназные рецепторы. ER $\alpha$ , активированный эстрадиолом, взаимодействует непосредственно с рецептором IGF-I, что приводит к активации сигнального пути, запускаемого через MAPK. Также есть данные о негеномных действиях 17 $\beta$ -эстрадиола, включая мобилизацию ионов внутриклеточного кальция, а также стимуляцию активности аденилатциклазы и продукцию цАМФ. Член семейства рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), GPR30 также с высокой аффинностью взаимодействует с эстрадиолом и частично отвечает за его быстрое негеномное действие [22, 24].

Системный уровень эстрадиола (E2) имеет значительные индивидуальные колебания, но всегда повышается в преовуляторную фазу менструального цикла или в фазу течки. Менопауза характеризуется исчезновением менструального цикла и снижением уровня циркулирующего эстрадиола [25–27].

В гиппокампе взрослых грызунов E2, взаимодействуя с ядерными ER, стимулирует нейрогенез, усиливает пролиферацию, ускоряет дифференцировку нейронов и увеличивает выживаемость клеток в зубчатой извилине [28]. E2 участвует в экспрессии генов, связанных с регуляцией транскрипции [29] и в усилении передачи сигналов ERK/MAPK [30]. Кроме того, эстрогены модулируют активность дофаминовых, серотониновых и холинергических ионотропных рецепторов. Введение E2 улучшает когнитивные функции у экспериментальных животных [25, 26], что связано с активацией эндогенного нейрогенеза [31–33]. Систематический обзор взаимосвязи между использованием гормональной терапии у женщин в постменопаузе с риском развития БА или ее применения для лечения симптоматики БА показывает, что из 11 контролируемых клинических испытаний, проведенных с января 1994 г. по декабрь 2020 г., в семи было показано улучшение когнитивных функций после гормональной терапии. В оставшихся четырех испытаниях не было обнаружено различий между пациентами с гормонотерапией и контрольной группой женщин [34].

В настоящее время становится ясно, что нейровоспаление играет значительную роль в инициации и прогрессировании БА, для которого характерны аномальная активация микроглии, приводящая к гиперпродукции белков острой фазы и вы-

свобождению провоспалительных цитокинов, интерлейкинов и хемокинов [35–39]. Однако ввиду противоречивости данных, полученных в разных исследованиях, нет определенной ясности в вопросе о том, как патологические изменения в головном мозге влияют на периферические показатели. Поиск маркеров, отражающих начавшийся нейродегенеративный процесс в мозге, важен как для ранней диагностики, так и для контроля эффективности проводимой терапии. Также известно, что E2 участвует в ингибировании нейровоспалительных сигнальных путей, связанных с IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF, и снижает уровень оксида азота и активных форм кислорода [40–44].

Возрастное снижение периферического E2, по-видимому, отражает аналогичный процесс в головном мозге и является одним из факторов риска БА. Корреляция между уровнями воспалительных факторов при БА в головном мозге и периферической системе весьма неоднозначна. В то же время белок YB-1 предотвращает развитие нейродегенерации в головном мозге. Это позволяет предположить, что введение YB-1 может оказывать влияние и на системный уровень эстрадиола у стареющих животных.

Целью работы было изучение эффектов длительного интраназального введения YB-1 на уровень E2 в плазме крови стареющих трансгенных самок 5xFAD — классической модели семейной формы БА [45] в сопоставлении с этим показателем у нетрансгенных мышей возрастного контроля. Также проведен анализ влияния интраназального введения YB-1 на маркеры периферического воспаления, связанного с нейровоспалением в мозге, для чего определены уровни провоспалительных интерлейкинов IL-1 $\beta$ , IL-6 в плазме у стареющих трансгенных самок 5xFAD до и после введения YB-1.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Животные*

Мыши линии 5xFAD — широко используемая модель семейной формы БА, получены на смешанном фоне SJL/C57B16 путем коэкспрессии гена *APP* человека (*APP*<sub>695</sub>) со шведской (K670N/M671L), флоридской (I716V) и лондонской (V717I) мутациями, а также гена пресенилина человека с мутациями M146L и L286V под *Thy1* промотором. Мыши 5xFAD были ранее приобретены у JAX и содержались на смешанном фоне SJL/C57B16. Животные содержались в специализированном виварии со свободным доступом к воде и стандартизированному корму при температуре 22–24°C и естественной освещенности.

Трансгенных мышей генотипировали с помощью классической ПЦР с использованием ДНК, выделенной из биоптатов уха. Наличие трансгенной кассеты выявляется с помощью праймеров 5'-AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG-3' и 5'-CGGG-GG TCT AGT TCT GCA T-3', с последующим электрофоретическим визуализированием для выявления носителей ТГ кассеты длиной 377 пар нуклеотидов. Трансгены вставлены в один локус Chr3:6297836, где они не влияют ни на какие известные гены.

Уровень E2 анализировали у 11–12-месячных трансгенных самок гетерозиготных мышей 5xFAD и однопаметных 11–12-месячных нетрансгенных самок возрастного контроля.

### *Интраназальное введение YB-1*

Белок YB-1 был любезно предоставлен нам академиком Л.П. Овчинниковым, руководившим совместными исследованиями свойств этого белка [3, 4, 10]. Мыши были разделены на четыре группы (по 6–9 животных в каждой) трансгенных (тг) и не-

трансгенных (нтг) мышей, получавших интраназально YB-1 — “тг + YB-1” и “нтг + YB-1”, а также группы животных, получавших физиологический раствор — “тг + ФР” и “нтг + ФР”. Раствор YB-1 (4 мкл, 0.5 мкг/мкл) или стерильный физиологический раствор вводили интраназально ежедневно в соответствии с обозначенной группой мышей в течение 40 дней. Для этого микропипетку располагали в непосредственной близости от ноздри животного так, чтобы раствор мог естественным путем попасть в носовую полость при нормальном дыхании.

#### *Определение стадий эстрального цикла*

У каждой самки брали вагинальные мазки (смывы) за 7 дней до начала эксперимента и 7 дней после окончания, включая дни забора плазмы. Забор мазков, а также визуальную оценку цитологической картины мазка проводили по общепринятой методике [46], что позволило выделить стадии эстрального цикла: проэструс, эструс, метэструс и диэструс. Нормальный цикл включает последовательную смену четырех стадий: проэструс, эструс, метэструс, диэструс, каждая из которых характеризуется специфической цитологической картиной. При проэструсе мазок состоит из отдельных округлых эпителиальных клеток с довольно крупным ядром; в стадии эструса присутствуют только крупные безъядерные ороговевающие клетки неправильной формы, при этом отсутствуют эпителиоциты и лейкоциты; стадия метэструса характеризуется наличием всех трех типов клеток. В мазке могут появляться лейкоциты, единичные эпителиоциты, слизь. В стадии диэструса в мазке присутствует большое количество лейкоцитов и слизи, а также единичные эпителиоциты.

#### *Забор крови*

Уровень E2 определяли в образцах крови из глазной вены за сутки до интраназального введения YB-1 и через 40 дней после применения препарата. Полученные образцы центрифугировали при 1000 g и 4–8°C в течение 15 мин (Eppendorf, Германия), после чего микропипеткой отбирали плазму крови. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Образцы плазмы хранили при температуре –80°C в соответствии с рекомендациями, изложенными в наборе для иммуноферментного анализа E2.

#### *Анализ уровня эстрадиола в плазме крови*

Уровень E2 в образцах периферической крови самок мышей определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора для иммуноферментного анализа на E2 (Cloud-Clone Corp., США). Следует отметить, что точность определения E2 методом иммуноферментного анализа используется наряду с другими, более точными методами, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография в тандеме с масс-спектрометрией [47, 48]. Все процедуры проводились в соответствии с инструкциями производителя. Согласно методике, в лунки планшета наносятся моноклональные антитела, специфичные к E2. Конкурентная ингибиторная реакция протекает между E2, меченным биотином, и немеченым E2 (стандарты или образцы) с нанесенными антителами специфичными к E2. После инкубации не связавшийся конъюгат смывают. Затем в каждую лунку планшета добавляют авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, и образцы инкубируют в течение обозначенного производителем времени. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации E2 в образце. После добавления раствора субстрата интенсивность окраски также обратно пропорциональна концентрации E2 в образце. Минимальное количество E2, кото-

рое можно определить с помощью этого набора, составляет менее 4.45 пг/мл. Оптическую плотность раствора в лунках определяли с помощью ридера Multiskan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм.

#### *Определение провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ и IL-6 в плазме крови*

Для оценки уровня провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  использовали наборы IL-6 ELISA и IL-1 $\beta$  ELISA (Abcam, США) с чувствительностью детекции цитокинов <0.8 и <6.5 пг/мл соответственно. На первом этапе одновременно инкубировали образцы и биотинилированные моноклональные антитела, специфичные к соответствующему интерлейкину. После промывки добавляли ферментный конъюгат стрептавидин-пероксидазы хрена, который связывает биотинилированные антитела при второй инкубации. После промывки добавляли субстратный раствор гидрохлорида тетраметилбензидина, который действует на связанный фермент, вызывая окрашивание продукта реакции. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации цитокина, присутствующего в образцах. С помощью Multiskan FC (Thermo Scientific, США) определяли оптическую плотность образцов при 450 нм.

#### *Статистический анализ*

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 12. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Для сравнения различий между группами и определения статистической значимости использовали: *t*-критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным сравнением групп по методу Тьюки, а также непараметрического критерия Манна–Уитни. Во всех случаях различия считались достоверными при  $p \leq 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные нами данные свидетельствуют, что у всех стареющих самок мышей, независимо от трансгенности, наблюдался измененный эстральный цикл. Некоторые стадии цикла отсутствовали или их последовательность была нарушена у большинства животных, что подтверждает наличие серьезных нарушений эстрального цикла у стареющих самок.

В табл. 1 представлены абсолютные индивидуальные значения уровня эстрадиола в плазме крови самок мышей на разных стадиях эстрального цикла до начала эксперимента. Стадии цикла определяли по вагинальным мазкам.

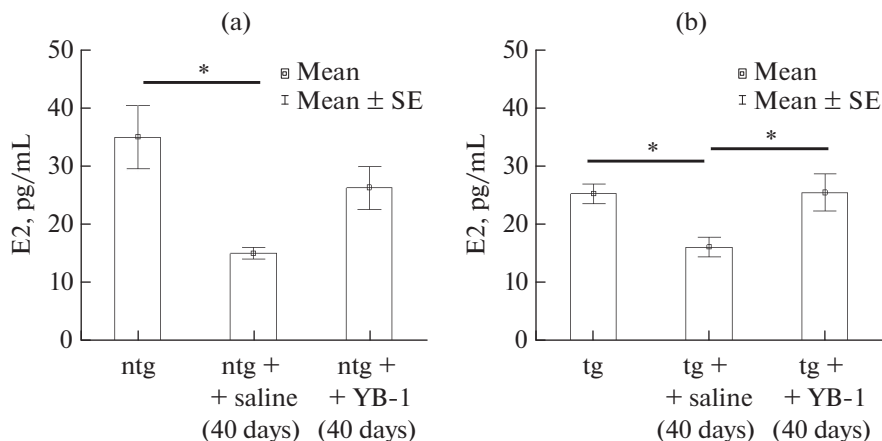
У каждой самки сначала определяли стадию эстрального цикла по вагинальным лаважам, а затем уровень эстрадиола, после чего рассчитывали средний уровень эстрадиола на каждом этапе как отношение суммы уровней эстрадиола к количеству животных на данном этапе и представляли как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Показаны значительные индивидуальные колебания уровня эстрадиола, не коррелирующие со стадиями эстрального цикла как у стареющих трансгенных, так и у нетрансгенных самок мышей. В начале экспериментов тг-животные характеризовались более низким средним уровнем E2 ( $25.27 \pm 1.74$  пг/мл) по сравнению с контрольными (нтг) стареющими мышами ( $34.95 \pm 5.45$  пг/мл) (рис. 1).

Уровни E2 были достоверно ( $p < 0.05$ ) снижены в контрольных группах “тг + ФР” (в среднем на 38%) и “нтг + ФР” (в среднем на 57%) через 40 дней после начала эксперимента.

Таблица 1. Содержание эстрадиола у мышей в начале эксперимента

| Группа животных | Стадия эстрального цикла | Уровень эстрадиола, пг/мл | Средний уровень эстрадиола на каждой стадии $\pm$ ст. ошибка среднего, пг/мл |
|-----------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| НТГ             | Проэструс                | 42.34                     | 42.34                                                                        |
|                 |                          |                           |                                                                              |
|                 | Эструс                   | 33.68                     | 46.57 $\pm$ 12.89                                                            |
|                 |                          | 59.45                     |                                                                              |
|                 | Метаэструс               | 8.45                      | 29.96 $\pm$ 12.26                                                            |
|                 |                          | 16.48                     |                                                                              |
|                 |                          | 30.94                     |                                                                              |
|                 |                          | 63.99                     |                                                                              |
|                 | Диэструс                 | 12.21                     | 33.18 $\pm$ 8.28                                                             |
|                 |                          | 17.36                     |                                                                              |
|                 |                          | 24.04                     |                                                                              |
|                 |                          | 28.79                     |                                                                              |
|                 |                          | 57.6                      |                                                                              |
|                 |                          | 59.05                     |                                                                              |
| ТГ              | Проэструс                | 28.42                     | 33.25 $\pm$ 2.42                                                             |
|                 |                          | 35.32                     |                                                                              |
|                 |                          | 36.01                     |                                                                              |
|                 | Эструс                   | 13.41                     | 23.52 $\pm$ 2.65                                                             |
|                 |                          | 23.89                     |                                                                              |
|                 |                          | 24.85                     |                                                                              |
|                 |                          | 26.97                     |                                                                              |
|                 |                          | 28.48                     |                                                                              |
|                 | Метаэструс               | 13.92                     | 23.59 $\pm$ 5.01                                                             |
|                 |                          | 26.15                     |                                                                              |
|                 |                          | 30.71                     |                                                                              |
|                 | Диэструс                 | 13.77                     | 23.58 $\pm$ 2.95                                                             |
|                 |                          | 19.02                     |                                                                              |
|                 |                          | 21.7                      |                                                                              |
|                 |                          | 23.38                     |                                                                              |
|                 |                          | 30.12                     |                                                                              |
|                 |                          | 33.47                     |                                                                              |



**Рис. 1.** Концентрация эстрадиола (E2) в плазме до эксперимента и через 40 дней после введения YB-1 у нетрансгенных (а) и трансгенных (б) стареющих мышей, пг/мл; статистическая обработка с использованием дисперсионного анализа с апостериорным сравнением по критерию Тьюки. \* $p < 0.05$ .

Согласно полученным данным, влияние возраста на уровень E2 более выражено у нтг-животных (на ~20%), по сравнению с тг. Важно отметить, что введение YB-1 замедляло возрастные изменения уровня E2 в плазме и предотвращало снижение содержания E2 как в группах “тг + YB-1”, так и в группах “нтг + YB-1”.

В наших экспериментах также было показано, что трансгенность самок мышей не влияет на уровень периферических провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и IL-6) (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Серьезные нарушения характеристик эстрального цикла, наблюдаемые нами у стареющих самок, позволяют предположить, что состояние подопытных мышей было близко к пременопаузальному периоду у женщин, когда происходит нарушение менструального цикла. Это позволяет нам экстраполировать полученные данные на человека, хотя, безусловно, в ограниченной степени.

Далее мы сравнили средние уровни гормонов в опытных группах до и через 40 дней после введения YB-1 без учета колебаний уровня E2 без разделения животных на группы, связанные со стадиями эстрального цикла.

Мы предполагаем, что снижение уровня E2 в обеих контрольных группах тг + ФР и нтг + ФР напрямую связано со старением. Следует отметить, что 40 дней жизни мыши примерно можно приравнять к 2.5 годам жизни человека. Известно, что предклимактерический период у женщин также длится от двух до четырех лет. Мы обнаружили, что влияние возраста на уровень E2 более выражено у нтг-животных

**Таблица 2.** Концентрация интерлейкинов плазмы до эксперимента и через 40 дней после введения YB-1 у трансгенных и нетрансгенных стареющих самок мышей

|                      | нтг (0д)        | нтг + ФР (40 д) | нтг + YB-1 (40 д) | тг (0 д)        | тг + ФР (40 д)  | тг + YB-1 (40 д) |
|----------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| IL-6 (пг/мл)         | 0.88 $\pm$ 0.22 | 0.86 $\pm$ 0.29 | 1.05 $\pm$ 0.25   | 0.89 $\pm$ 0.19 | 0.86 $\pm$ 0.16 | 0.74 $\pm$ 0.17  |
| IL-1 $\beta$ (пг/мл) | 6.22 $\pm$ 0.4  | 5.86 $\pm$ 0.21 | 5.67 $\pm$ 0.15   | 6.25 $\pm$ 0.22 | 6.1 $\pm$ 0.3   | 5.97 $\pm$ 0.19  |

(на ~20%) по сравнению с тг. Мы полагаем, что тг-мышы на момент начала эксперимента уже прошли фазу интенсивного возрастного снижения E2, так как самки тг-мышей характеризовались более низким уровнем E2 еще до начала экспериментов. Ранее, при анализе морфологического состояния нейронов гиппокампа мы выявили, что у животных 5xFAD, классической модели семейной формы БА, признаки старения и дегенерации появляются значительно раньше, чем у нтг-мышей того же возраста [49]. В связи с этим мы полагаем, что самки тг-мышей фактически имеют более преклонный биологический возраст, чем самки нтг, хотя календарный возраст у них одинаков. Важно отметить, что лечение YB-1 препятствовало развитию возрастных изменений в уровне E2 в плазме, а следовательно, замедляло старение как в группах “тг + YB-1”, так и в группах “нтг + YB-1”.

Как было показано ранее другими авторами, снижение уровня эстрадиола усугубляет патологию у животных, моделирующих БА. Так, овариэктомия индуцировала активацию микроглии, увеличение продукции  $\beta$ -амилоида и ухудшение памяти у мышей линии 3xTg [50]. Также овариэктомия усугубляла патологию головного мозга, вызванную внутрижелудочковым введением A $\beta$ 1-42 [51]. Терапия с помощью E2 значительно снижала или даже устраняла эффект хирургического вмешательства в этих опытах, что доказывает защитную роль половых гормонов, препятствующих развитию нейродегенерации.

Изменение уровня эстрадиола тесно связано с нейродегенерацией альцгеймеровского типа у тг-животных. Ранее мы показали, что интраназальное введение YB-1 оказывает положительный эффект на двух животных моделях БА [10]. В данном исследовании мы обнаружили, что YB-1 предотвращает возрастное снижение уровня E2 в плазме крови как у стареющих самок мышей линии 5xFAD, так и у не-трансгенных животных. Необходимо иметь в виду, что E2 отвечает за многие функции головного мозга, в частности стимулирует образование дендритных шипиков на нейронах гиппокампа [52, 53], предотвращает агрегацию  $\beta$ -амилоида, снижает его нейротоксичность, а также оказывает защитное действие на митохондрии [54, 55]. Подробные механизмы этого эффекта YB-1 требуют дальнейшего тщательного изучения. Мы предполагаем существование перекрестных факторов, регулирующих периферический и центральный уровни E2, поскольку одной из мишеней YB-1 является синтез половых гормонов, регулируемый в головном мозге. Имеются данные, что YB-1 необходим для фолликулостимулирующей гормон-опосредованной активации генов *Cyp19a1*, *Hsd17b1* и *Pappa*, которые участвуют в биосинтезе эстрогенов [56] и показывают ранее не идентифицированную роль YB-1. В недавнем исследовании было показано, что E2 у самок мышей линии 5xFAD выполняет нейропротекторные функции, снижая интенсивность  $\beta$ -амилоидного каскада, а также подавляя такой патологический белок, связанный с БА, как pTau [57].

В наших экспериментах было показано, что трансгенность мышей не влияет на уровень периферических провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$  и IL-6) (табл. 2), хотя некоторые авторы сообщают о повышенном уровне этих цитокинов в мозге трансгенных мышей и крыс [58–60]. Здесь следует отметить, что в настоящее время нет четкого понимания того, как соотносятся мозговой и периферический уровни провоспалительных факторов, в частности цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-6, хотя уровень этих интерлейкинов заметно повышен в мозге больных БА. У человека соотношение уровней церебрального и периферического IL-1 $\beta$  может составлять 1 : 15–1 : 30. Для животных моделей сообщалось, что экспрессия IL-1 $\beta$  и IL-6 была значительно увеличена в гиппокампе мышей 5xFAD по сравнению с мышами дикого типа. Во время начальной воспалительной реакции микроглия активируется A $\beta$  для высвобождения цитокинов. Провоспалительные медиаторы, такие как IL-6, IL-1 $\beta$ , связываются с рецепторами на мембране микроглии и активируют сигнальный путь NF- $\kappa$ B. Фосфорилированный NF- $\kappa$ B проникает в ядро и активирует си-

стему транскрипции для выработки большего количества провоспалительных факторов. При этом цитокины, продуцируемые активированной микроглией, ускоряют выработку АВ путем процессинга и модификации APP, тем самым усугубляя нейровоспаление [61]. В настоящее время нет единого мнения о том, как изменяется уровень интерлейкинов в плазме крови у пациентов с БА по сравнению со здоровым контролем [62]. Сообщается как об увеличении, так и о снижении уровня интерлейкинов [63–66]. Используя наши (табл. 2, тг (0 д)) и литературные данные, можно рассчитать, что примерное соотношение церебрального и периферического уровней IL-1β у мышей 5xFAD находится в диапазоне 1 : 12–1 : 22. (0.5 пг/мл : 6.03 пг/мл–0.3 пг/мл : 6.47 пг/мл, в абсолютных значениях) соответственно. По-видимому, повышение содержания цитокинов в ткани мозга в определенных пределах может не влиять на их системный уровень и остается незамеченным. По-видимому, это одна из причин, по которой нам не удалось выявить влияние введения YB-1 на уровень периферических интерлейкинов или выявить различия в уровне провоспалительных цитокинов в плазме крови самок трансгенных мышей и мышей дикого типа. Системное воспаление, наоборот, может индуцировать нейровоспаление, которому также способствует разрушение гематоэнцефалического барьера, характерное для многих заболеваний.

Таким образом, наши результаты показывают, что интраназальное введение белка YB-1 оказывает положительный эффект, замедляя возрастное падение уровня эстрадиола в плазме крови как у трансгенных, так и у нетрансгенных стареющих самок мышей. Трансгенность мышей не влияет на уровень периферических провоспалительных цитокинов (IL-1β и IL-6). Также интраназальное введение YB-1 не влияет на уровень IL-1β и IL-6 в плазме крови трансгенных и нетрансгенных животных.

Воздействуя на регуляторные механизмы в головном мозге, белок YB-1 эффективно задерживает возрастное падение уровня E2 и может рассматриваться как перспективное соединение для разработки профилактического и терапевтического средства против нейродегенеративных заболеваний, а также старения у женщин.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводились в полном соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными и правилами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г., № 199н). Все процедуры на животных были одобрены Комиссией по биобезопасности и биоэтике (Институт биофизики клетки – Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, разрешение № 3 от 12 июня 2020 г.) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 18-15-00392-П).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Спонсоры не участвовали в разработке исследования; при сборе, анализе или интерпретации данных; в написании рукописи или в решении опубликовать результаты.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.В.Б., Р.А.П.), сбор данных (Н.В.Б., Д.Ю.Ж., В.И.К.), обработка данных (Н.В.Б., А.В.Ч.), написание и редактирование манускрипта (Д.Ю.Ж., В.И.К., А.В.Ч., Н.В.Б., Р.А.П., Г.Т.С.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar A, Singh A, Ekavali (2015) A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol Rep* 67: 195–203.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>
2. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M (2003) The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 25: 691–698.  
<https://doi.org/10.1002/bies.10300>
3. Skabkin MA, Evdokimova V, Thomas AA, Ovchinnikov LP (2001) The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strand annealing. *J Biol Chem* 276: 44841–44847.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.m107581200>
4. Skabkin MA, Kiselyova OI, Chernov KG, Sorokin AV, Dubrovin EV, Yaminsky IV, Vasiliev VD, Ovchinnikov LP (2004) Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Res* 32: 5621–5635.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh889>
5. Frye BC, Halfier S, Djudjaj S, Muehlenberg P, Weber S, Raffetseder U, En-Nia A, Knott H, Baron JM, Dooley S, Bernhagen J, Mertens PR (2009) Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep* 10: 783–789.  
<https://doi.org/10.1038/embor.2009.81>
6. Moiseeva NI, Stromskaya TP, Rybalkina EY, Vaiman AV, Malyshkina MA, Kim ER, Eliseeva IA, Kulakovskiy IV, Ovchinnikov LP, Stavrovskaya AA (2013) Effects of extracellular YB-1 protein on cultured cells of human breast cancer. *Biochem Suppl Ser A Membr Cell Biol* 7: 21–28.
7. Fotovati A, Abu-Ali S, Wang P-S, Deleyrolle LP, Lee C, Triscott J, Chen JY, Franciosi S, Nakamura Y, Sugita Y, Uchiumi T, Kuwano M, Leavitt BR, Singh SK, Jury A, Jones C, Wakimoto H, Reynolds BA, Pallen CJ, Dunn SE (2011) YB-1 bridges neural stem cells and brain tumor-initiating cells via its roles in differentiation and cell growth. *Cancer Res* 71: 5569–5578.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2805>
8. Lu ZH, Books JT, Ley TJ (2005) YB-1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. *Mol Cell Biol* 25: 4625–4637.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.25.11.4625-4637.2005>
9. Hanssen L, Frye B, Ostendorf T, Alidousty C, Djudjaj S, Boor P, Rauen T, Floege J, Mertens P, Raffetseder U (2011) Y-Box Binding Protein-1 Mediates Profibrotic Effects of Calcineurin Inhibitors in the Kidney. *J Immunol* 187: 298–308.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100382>
10. Bobkova NV, Lyabin DN, Medvinskaya NI, Samokhin AN, Nekrasov PV, Nesterova I V, Aleksandrova IY, Tatarnikova OG, Bobylev AG, Vikhlyantsev IM, Kukharsky MS, Ustyugov AA, Polyakov DN, Eliseeva IA, Kretov DA, Guryanov SG, Ovchinnikov LP (2015) The Y-Box Binding Protein 1 Suppresses Alzheimer's Disease Progression in Two Animal Models. *PLoS One* 10: e0138867.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138867>
11. Henderson VW, Paganini-Hill A, Miller BL, Elble RJ, Reyes PF, Shoupe D, McCleary CA, Klein RA, Hake AM, Farlow MR (2000) Estrogen for Alzheimer's disease in women: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 54(2): 295–301.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.54.2.295>
12. Vest RS, Pike CJ (2013) Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease. *Horm Behav* 63: 301–307.  
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.04.006>
13. Grimm A, Lim Y-A, Mensah-Nyagan AG, Götz J, Eckert A (2012) Alzheimer's Disease, Oestrogen and Mitochondria: an Ambiguous Relationship. *Mol Neurobiol* 46: 151–160.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-012-8281-x>
14. Coffey CE, Lucke JF, Saxton JA, Ratcliff G, Unitas LJ, Billig B, Bryan RN (1998) Sex Differences in Brain Aging: A Quantitative Magnetic Resonance Imaging Study. *Arch Neurol* 55: 169–179.  
<https://doi.org/10.1001/archneur.55.2.169>
15. Morinaga A, Ono K, Takasaki J, Ikeda T, Hirohata M, Yamada M (2011) Effects of sex hormones on Alzheimer's disease-associated  $\beta$ -amyloid oligomer formation *in vitro*. *Exp Neurol* 228: 298–302.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.011>
16. Veiga S, Melcangi RC, DonCarlos LL, Garcia-Segura LM, Azcoitia I (2004) Sex hormones and brain aging. *Exp Gerontol* 39: 1623–1631.  
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.05.008>
17. Barron AM, Pike CJ (2012) Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. *Front Biosci Elit* 4 E: 976–997.  
<https://doi.org/10.2741/e434>

18. *Maioli S, Leander K, Nilsson P, Nalvarte I* (2021) Estrogen receptors and the aging brain. *Essays Biochem* 65: 913–925.  
<https://doi.org/10.1042/EBC20200162>
19. *Chen P, Li B, Ou-Yang L* (2022) Role of estrogen receptors in health and disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13: 839005.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.839005>
20. *Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM* (2001) Estrogen receptor  $\alpha$ , not  $\beta$ , is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1952–1957.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.041483198>
21. *Pérez SE, Chen EY, Mufson EJ* (2003) Distribution of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive profiles in the postnatal rat brain. *Dev Brain Res* 145: 117–139.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(03\)00223-2](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(03)00223-2)
22. *Hazell GGJ, Yao ST, Roper JA, Prossnitz ER, O'Carroll AM, Lolait SJ* (2009) Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol* 202: 223–236.  
<https://doi.org/10.1677/JOE-09-0066>
23. *Luoma JJ, Boulware MI, Mermelstein PG* (2008) Caveolin proteins and estrogen signaling in the brain. *Mol Cell Endocrinol* 290: 8–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.005>
24. *Bjornstrom L, Sjoberg M* (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19(4): 833–842.  
<https://doi.org/10.1210/me.2004-0486>
25. *Gordon JL, Peltier A, Grummisch JA, Sykes Tottenham L* (2019) Estradiol fluctuation, sensitivity to stress, and depressive symptoms in the menopause transition: a pilot study. *Front Psychol* 10: 1319.  
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.01319>
26. *Carugno J* (2020) Clinical management of vaginal bleeding in postmenopausal women. *Climacteric* 23(4): 343–349.  
<https://doi.org/10.1080/13697137.2020.1739642>
27. *Mueck AO, Römer T* (2019) Choice of progestogen for endometrial protection in combination with transdermal estradiol in menopausal women. *Horm Mol Biol Clin Invest* 37(2).  
<https://doi.org/10.1515/hmbci-2018-0033>
28. *Duarte-Guterman P, Lieblich SE, Chow C, Galea LAM* (2015) Estradiol and GPER Activation Differentially Affect Cell Proliferation but Not GPER Expression in the Hippocampus of Adult Female Rats. *PLoS One* 10: e0129880.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129880>
29. *Aenlle K, Cui L, Jackson T, Foster T* (2007) Estrogen effects on cognition and hippocampal transcription in middle-aged mice. *Neurobiol Aging* 30: 932–945.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.09.004>
30. *Fan L, Zhao Z, Orr PT, Chambers CH, Lewis MC, Frick KM* (2010) Estradiol-induced object memory consolidation in middle-aged female mice requires dorsal hippocampal extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurosci* 30: 4390–4400.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4333-09.2010>
31. *Walf AA, Paris JJ, Frye CA* (2009) Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology* 34(6): 909–916.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.01.004>
32. *Cui J, Reed J, Crynen G, Ait-Ghezala G, Crawford F, Shen Y, Li R* (2019) Proteomic Identification of Pathways Responsible for the Estradiol Therapeutic Window in AD Animal Models. *Front Cell Neurosci* 13: 437.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.004>
33. *Sahab-Negah S, Hajali V, Moradi HR, Gorji A* (2020) The Impact of Estradiol on Neurogenesis and Cognitive Functions in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* 40: 283–299.  
<https://doi.org/10.1007/s10571-019-00733-0>
34. *Cardinali CAEF, Martins YA, Torráo AS* (2021) Use of Hormone Therapy in Postmenopausal Women with Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Drugs Aging* 38: 769–791.  
<https://doi.org/10.1007/s40266-021-00878-y>
35. *Grammas P* (2011) Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 8: 26.  
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-26>

36. *Ferreira ST, Clarke JR, Bomfim TR, De Felice FG* (2014) Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 10: S76–S83. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.12.010>
37. *Walters A, Phillips E, Zheng R, Biju M, Kuruvilla T* (2016) Evidence for neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Prog Neurol Psychiatry* 20: 25–31. <https://doi.org/10.1002/pnp.444>
38. *Meraz-Ríos MA, Toral-Ríos D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V* (2013) Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Front Integr Neurosci* 7: 59. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00059>
39. *Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper N, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich B, Finch C, Frautschy S, Griffin W, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie I, McGeer P, O'Banion M, Pachter J, Pasinetti G, Plata-salamán C, Rogers J, Rydel R, Yong Shen, Streit W, Strohmeier R, Tooyoma Ikuo, Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B., Wenk G, Wyss-Coray T* (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21(3): 383–421. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00124-X](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00124-X)
40. *O'Leime C, Cryan J, Nolan Y* (2017) Nuclear Deterrents: Intrinsic Regulators of IL-1 $\beta$ -induced Effects on Hippocampal Neurogenesis. *Brain Behav Immun* 66: 394–412. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.07.153>
41. *Khaksari M, Soltani Z, Shahrokhi N* (2018) Effects of Female Sex Steroids Administration on Pathophysiologic Mechanisms in Traumatic Brain Injury. *Transl Stroke Res* 9:393–416. <https://doi.org/10.1007/s12975-017-0588-5>
42. *Wang M, Tsai BM, Reiger KM, Brown JW, Meldrum DR* (2006) 17- $\beta$ -Estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 40(2): 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.06.019>
43. *Cuzzocrea S, Santagati S, Sautebin L, Mazzon E, Calabrò G, Serraino I, Caputi AP, Maggi A* (2000) 17 $\beta$ -estradiol antiinflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. *Endocrinology* 141(4): 1455–1463. <https://doi.org/10.1210/endo.141.4.7404>
44. *Borrás C, Gambini J, López-Grueso R, Pallardó FV, Viña J* (2010) Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Basis Disease* 1802(1): 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.007>
45. *Oakley HO, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Distenhof J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R* (2006) Intraneuronal  $\beta$ -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci* 26: 10129–10140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
46. *McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SAL* (2012) Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp* e4389. <https://doi.org/10.3791/4389>
47. *Farré M, Kuster M, Brix R, Rubio F, de Alda MJL, Barceló D* (2007) Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography–quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. *J Chromatogr A* 1160(1–2): 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.032>
48. *Nilsson ME, Vandenput L, Tivesten Å, Norlén A-K, Lagerquist MK, Windahl SH, Börjesson AE, Farman HH, Poutanen M, Benrick A, Maliqueo M, Stener-Victorin E, Ryberg H, Ohlsson C* (2015) Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Endocrinology* 156: 2492–2502. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1890>
49. *Evgen'ev M, Bobkova N, Krasnov G, Garbuz D, Funikov S, Kudryavtseva A, Kulikov A, Samokhin A, Maltsev A, Nesterova I* (2019) The Effect of Human HSP70 Administration on a Mouse Model of Alzheimer's Disease Strongly Depends on Transgenic and Age. *J Alzheimer's Dis* 67: 1391–1404. <https://doi.org/10.3233/JAD-180987>
50. *Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ* (2007) Progesterone and Estrogen Regulate Alzheimer-Like Neuropathology in Female 3xTg-AD Mice. *J Neurosci* 27(48): 13357–13365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2718-07.2007>

51. Yun J, Jun I, Ju C, Choi D, Im H, Youg J (2018) Brain, Behavior, and Immunity Estrogen deficiency exacerbates A $\beta$ -induced memory impairment through enhancement of neuroinflammation, amyloidogenesis and NF- $\kappa$ B activation in ovariectomized mice. *Brain Behav Immun* 73: 282–293.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.05.013>
52. Murphy DD, Segal M (1997) Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(4): 1482–1487.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1482>
53. Aenlle KK, Foster TC (2010) Aging alters the expression of genes for neuroprotection and synaptic function following acute estradiol treatment. *Hippocampus* 20: 1047–1060.  
<https://doi.org/10.1002/hipo.20703>
54. Nilsen J, Chen S, Irwin RW, Iwamoto S, Brinton RD (2006) Estrogen protects neuronal cells from amyloid beta-induced apoptosis via regulation of mitochondrial proteins and function. *BMC Neurosci* 7(1): 1–14.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-74>
55. Yao J, Brinton RD (2012) Estrogen regulation of mitochondrial bioenergetics: implications for prevention of Alzheimer's disease. *Advance Pharmacol* 64: 327–371.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394816-8.00010-6>
56. Donaubaue EM, Hunzicker-Dunn ME (2016) Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)-dependent Phosphorylation of Y-Box-binding Protein 1 (YB-1) Enhances Gene Expression in Granulosa Cells in Response to Follicle-stimulating Hormone (FSH). *J Biol Chem* 291: 12145–12160.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.705368>
57. Kim JY, Mo H, Kim J, Kim JW, Nam Y, Rim YA, Ju JH (2022) Mitigating Effect of Estrogen in Alzheimer's Disease-Mimicking Cerebral Organoid. *Front Neurosci* 16: 816174.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.816174>
58. Boza-Serrano A, Yang Y, Paulus A, Deierborg T (2018) Innate immune alterations are elicited in microglial cells before plaque deposition in the Alzheimer's disease mouse model 5xFAD. *Sci Rep* 8: 1550.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19699-y>
59. Hanzel CE, Pichet-Binette A, Pimentel LSB, Iulita MF, Allard S, Ducatenzeiler A, Do Carmo S, Cuellar AC (2014) Neuronal driven pre-plaque inflammation in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35: 2249–2262.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.026>
60. López-González I, Schlüter A, Aso E, Garcia-Esparcia P, Ansoleaga B, Lorens F, Carmona M, Moreno J, Fuso A, Portero-Otin M, Pamplona R, Pujol A, Ferrer I (2015) Neuroinflammatory signals in Alzheimer disease and APP/PS1 transgenic mice: correlations with plaques, tangles, and oligomeric species. *J Neuropathol Exp Neurol* 74: 319–344.  
<https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000176>
61. Jiang Y, Li K, Li X, Xu L, Yang Z (2021) Sodium butyrate ameliorates the impairment of synaptic plasticity by inhibiting the neuroinflammation in 5XFAD mice. *Chem-Biol Interact* 341: 109452.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109452>
62. Park J-C, Han S-H, Mook-Jung I (2020) Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease: a brief review. *BMB Rep* 53: 10–19.  
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.1.309>
63. Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Mendonça VA, Ojopi EB, Gattaz WF, Teixeira A L (2009) Increased serum IL-1 $\beta$  level in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 28(6): 507–512.  
<https://doi.org/10.1159/000255051>
64. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N (2010) A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 68(10): 930–941.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.012>
65. Wu YY, Hsu JL, Wang HC, Wu SJ, Hong CJ, Cheng IHJ (2015) Alterations of the neuroinflammatory markers IL-6 and TRAIL in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 5(3): 424–434.  
<https://doi.org/10.1159/000439214>
66. Richartz E, Stransky E, Batra A, Simon P, Lewczuk P, Buchkremer G, Bartels M, Schott K (2005) Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? *J Psychiatr Res* 39(5): 535–543.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2004.12.005>

**YB-1 Protein Prevents Age Decline in Plasma Estradiol  
in 5xFAD Transgenic Aging Female Mice****D. Yu. Zhdanova<sup>a</sup>, V. I. Kovalev<sup>a</sup>, A. V. Chaplygina<sup>a</sup>, N. V. Bobkova<sup>a</sup>,  
R. A. Poltavtseva<sup>b, \*</sup>, and G. T. Sukhikh<sup>b</sup>**<sup>a</sup> *Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia*<sup>b</sup> *Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology  
Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia**\*e-mail: rimpol@mail.ru*

Alzheimer's disease (AD) is an incurable neurodegenerative disease that is the main cause of dementia in the elderly. When looking for new treatments for AD, attention was drawn to the multifunctional Y-box-binding protein 1 (YB-1). Previously, we revealed a positive effect of intranasal administration of YB-1 on learning and spatial memory, along with a decrease in the content of cerebral  $\beta$ -amyloid and the intensity of plaque initiation, with an improvement in the survival of neurons in the cortex and hippocampus of male AD mice. However, AD affects women twice as often as men, so it is of great interest to study the effects of YB-1 on aging females. Estrogens and androgens are necessary for the maintenance of cognitive function during aging and, apparently, may prevent the development of AD. In this work, peripheral levels of estradiol (E2) and cytokines were studied after intranasal administration of YB-1 to aging female 5xFAD transgenic mice and control non-transgenic animals. In intact aging animals of both groups, a violation of the estrous cycle and a decrease in the level of E2 in blood plasma were revealed. Mice treated with YB-1 did not show a characteristic age-related decrease in plasma E2 levels. The introduction of YB-1 did not affect the peripheral level of cytokines. Thus, a novel, previously undescribed effect of YB-1 on plasma E2 levels in aging female mice is shown. These data indicate that YB-1 may be a promising compound in the prevention and treatment of neurodegenerative diseases. However, further experiments are needed to gain insight into the detailed mechanisms of YB-1 action.

**Keywords:** estradiol, aging, YB-1, 5xFAD, interleukins

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

ЛЕТАЛЬНАЯ АГРЕССИЯ У СОДЕРЖАЩИХСЯ В НЕВОЛЕ ОБЕЗЬЯН

© 2023 г. В. Г. Чалян<sup>1</sup>, Н. В. Мейшвили<sup>1, \*</sup>, И. Г. Пачулия<sup>1</sup>,  
Е. Н. Аникаева<sup>1</sup>, Д. В. Задорожный<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи, Россия

\*E-mail: natela\_prim@list.ru

Поступила в редакцию 24.10.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 23.12.2022 г.

Установление особенностей летальной агрессии обезьян, оценка половозрастной принадлежности агрессоров и жертв, характера действий агрессоров представляется необходимым для выявления эволюционных корней случаев летальной агрессии человека. Кроме того, исследование особенностей летальной агрессии может рассматриваться в качестве условия для разработки мер, направленных на предупреждение ее проявлений у содержащихся в неволе обезьян. Целью исследования явилось изучение видоспецифических особенностей летальной агрессии у содержащихся в неволе макак, павианов и мартышек. Был проведен анализ случаев внутригрупповой летальной агрессии, имевших место в течение 10-летнего периода у содержащихся социальными группами макак резусов (*Macaca mulatta*), макак яванских (*Macaca fascicularis*), макак лапундеров (*Macaca nemestrina*), павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*), павианов анубисов (*Papio anubis*) и зеленых мартышек (*Chlorocebus aethiops*). Установлено, что случаи летальной агрессии отмечаются у всех 6 исследованных видов обезьян. Показано, что в группах, состоящих из взрослых самцов, наибольшая частота случаев летальной агрессии отмечена у макак резусов, наименьшая — у павианов гамадрилов. Обнаружены видоспецифические различия в характере летальной агрессии в семейных группах обезьян, состоящих из самцов, самок, детенышей и подростков. Установлено, что у павианов гамадрилов, павианов анубисов и макак лапундеров, то есть у видов с выраженным половым диморфизмом в размерах тела и в социальном статусе, основной формой летальной агрессии в семейных группах является инфантицид, совершаемый одиночным половозрелым самцом. У макак резусов, макак яванских и зеленых мартышек, то есть тех видов, для которых характерны относительно слабо выраженный половой диморфизм в размерах тела и в социальном статусе, преобладающей формой летальной агрессии в семейных группах являются коллективные действия самок, направленные на молодых и взрослых членов группы.

**Ключевые слова:** павианы, макаки, мартышки, летальная агрессия, инфантицид, агрессоры, жертвы

**DOI:** 10.31857/S0869813923020036, **EDN:** NDLFHG

ВВЕДЕНИЕ

Внутривидовая летальная агрессия, то есть, агрессивные действия, приводящие к смерти жертвы своего вида, описаны у 40% видов млекопитающих [1], включая человека [2]. Случаи убийства особей своего вида описаны у 132 видов приматов [3] как в естественных условиях [4–6], так и в условиях зоопарков и питомников [7, 8].

К числу видов приматов, наиболее склонных к летальной внутривидовой агрессии, относятся, прежде всего, шимпанзе (*Pan troglodytes*), у которых подобные случаи с разной частотой отмечаются в большинстве изученных популяций [9–12]. Случаи смерти особей от травм, нанесенных другими особями своего вида, отмечаются также у кошачьих лемуров (*Lemur catta*) [13], ревунов (*Ateles geoffroyi yucatanensis*) [6], макаков резусов (*Macaca mulatta*) [14], капуцинов (*Cebus capucinus*) [4], паукообразных обезьян (*Brachyteles arachnoides*) [5], горилл (*Gorilla beringei*) [15] и многих других видов.

Список приматов, способных нанести смертельную травму особям своего вида, включает в себя даже те виды, которые принято рассматривать как наименее склонных к жесткой агрессии. Так, крайне редко, но отмечаются случаи летальной агрессии у гиббонов (*Hylobates lar*) [16], орангутанов (*Pongo pygmaeus*) [17] и бонобо (*Pan paniscus*) [12]. У человека уровень летальной агрессии рассматривается как сопоставимый с уровнем шимпанзе [18] и может достигать 2% от общей смертности [1].

Среди агрессоров первое место принадлежит самцам [5, 8, 12, 19], активные действия которых, по разным данным, обеспечивают основную часть отмечаемой в группах летальной агрессии. Тем не менее, случаи нанесения смертельных травм самками также достаточно многочисленны [7, 13, 17, 20, 21].

Представляется, что исследование проявлений летальной агрессии у приматов имеет большое научное значение. Прежде всего, очевидно, что установление особенностей летальной агрессии, оценка половозрастной принадлежности агрессоров и жертв, характера действий агрессоров является необходимым для выявления эволюционных корней происходящего. Кроме того, несомненно, важным является проведение подобных исследований для предупреждения этого негативного феномена у содержащихся в неволе социальными группами лабораторных приматов. При этом исследование особенностей летальной агрессии может рассматриваться в качестве условия для разработки мер, направленных на предупреждение проявлений летальной агрессии в группах обезьян. Исходя из вышесказанного, нами была сделана попытка проанализировать видовую специфику случаев летальной агрессии у содержащихся социальными группами низших узконосых обезьян.

Следует отметить, что содержание обезьян в неволе и связанные с этим некоторые воздействия и ограничения оказывают определенное влияние на их биологию и поведение. В частности, содержащиеся в неволе обезьяны, неизбежно, испытывают скученность, а также ограничения, связанные с отсутствием условий для свободного обмена особями между группами. Тем не менее, представляется, что содержание обезьян группами в просторных вольерах в значительной степени устраняет последствия негативного влияния неволи и создает возможности для изучения механизмов, лежащих в основе таких сложных и опасных поведенческих проявлений как летальная агрессия.

Целью исследования явилось изучение видоспецифических особенностей летальной агрессии у содержащихся в неволе макаков, павианов и мартышек.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представлены результаты анализа случаев летальной агрессии, имевших место у 6 видов обезьян питомника Института медицинской приматологии на протяжении периода времени с 2001 по 2010 гг.: макаков резусов (*Macaca mulatta*), макаков яванских (*Macaca fascicularis*), макаков лапундеров (*Macaca nemestrina*), мартышек зеленых (*Chlorocebus aethiops*), павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*) и павианов анубисов (*Papio anubis*). Животные содержались социальными группами в 112 вольерах и 158 групповых клетках питомника. Каждая вольера представляла собой конструкцию, состоящую из наружной части, площадью 200–600 кв м и примыка-

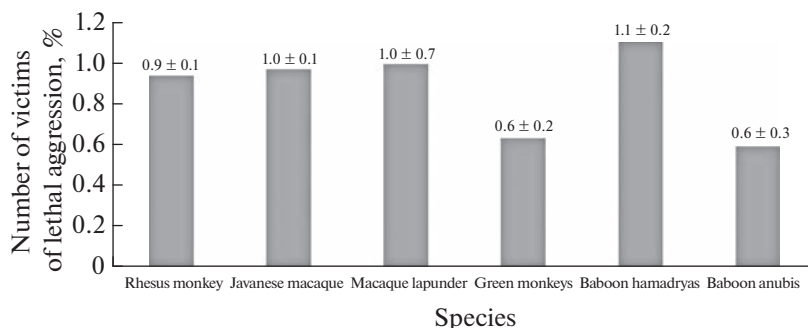
ющего отапливаемого помещения. В каждой вольере, в зависимости от площади, содержалось 30–70 животных. В групповых клетках, площадью 9 кв. м каждая, содержалось по 3–5 животных. Все животные были точно идентифицированы, имели индивидуальный номер, родственные отношения были известны. Использовался метод содержания обезьян, предполагающий ограничение вмешательства персонала в жизнь обезьян только необходимыми процедурами: ежедневной уборкой и кормлением, отловом животных, по крайней мере, один раз в год для профилактического осмотра, отловом детенышей для нанесения татуировкой индивидуальных номеров и отловом больных животных, по мере необходимости. Ежедневно персоналом осуществлялись визуальные наблюдения всех животных для оценки их состояния, выявления больных, слабых, погибших, оценки социального климата и происходящих изменений в поведении членов каждой группы.

Численность обезьян, содержавшихся социальными группами в вольерах и групповых клетках питомника, варьировала в разные годы изучаемого периода следующим образом: макаки резусы — от 978 до 1846 особей, макаки яванские — от 578 до 992 особей, макаки лапундеры — от 57 до 99 особей, мартышки зеленые — от 118 до 167 особей, павианы гамадрилы — от 465 до 1135 особей, павианы анубисы — от 94 до 279 особей. При этом основная часть животных содержалась в так называемых “семейных” группах, включающих самцов, самок, подростков и детенышей. Численность особей в семейных группах в разные годы изучаемого периода составила: макаки резусы — 1012–1520 особей; макаки яванские — 553–852 особей, макаки лапундеры — 73–88 особей, зеленые мартышки — 100–144 особи, павианы гамадрилы — 442–1093 особи, павианы анубисы — 94–279 особей. Кроме семейных групп, некоторая — сравнительно небольшая часть животных содержалась в этот период в так называемых “самцовых” группах, состоящих исключительно из взрослых самцов. Количество самцов, содержащихся в таких группах, варьировало в разные годы: от 73 до 287 макаков резусов, от 25 до 176 макаков яванских, от 15 до 17 зеленых мартышек, от 23 до 86 павианов гамадрилов. Самцовых групп павианов анубисов и макаков лапундеров в этот период времени в питомнике не было.

В анализ включены 302 случая летальной внутригрупповой агрессии, то есть тех случаев, когда особям — членам социальной группы другими членами группы были нанесены травмы, завершившиеся смертью животного, независимо от того, получали ли животные лечение после обнаружения персоналом травмы или нет. При этом в анализ включены только те случаи, когда смерть животного являлась непосредственным следствием травмы, а не была вызвана имеющимися заболеваниями. В анализ не были включены случаи, когда получившее травму животное было пролечено и выздоровело. Для установления уровня летальной агрессии у обезьян разных видов и разных половозрастных категорий использовались следующие показатели: 1) общее число жертв летальной агрессии, зафиксированных к концу каждого года в группах с соответствующей структурой — семейных или самцовых; 2) средний процент жертв летальной агрессии, вычислявшийся по формуле — количество жертв в течение каждого года/среднее количество особей во всех соответствующих группах по данным на начало и конец каждого года; 3) число и половозрастная принадлежность агрессоров, принимавших участие в актах летальной агрессии в течение каждого года. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием непараметрического *U*-критерия Манн–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В течение 10 лет исследованного периода случаи летальной агрессии были отмечены у всех шести изучавшихся видов обезьян питомника. В общей сложности за это время были зафиксированы 302 случая гибели животных от травм, нанесенных



**Рис. 1.** Средний ежегодный процент содержащихся в социальных группах обезьян, ставших жертвами летальной агрессии.

членами группы. В среднем, среди обезьян питомника, содержащихся социальными группами, от последствий летальной агрессии ежегодно погибало  $0.87 \pm 0.14\%$  общего числа животных. На рис. 1 показана средняя доля обезьян, становившихся ежегодно жертвами летальной агрессии, подсчитанная исходя из количества жертв и количества обезьян данного вида, содержащихся социальными группами.

У макаков резусов, макаков яванских, макаков лапундеров и павианов гамадрилов, средний уровень особей, ежегодно становящихся жертвами внутригрупповой летальной агрессии, приближался к 1% общей численности содержащихся группами животных. У павианов анубисов и мартышек зеленых показатели ежегодной смертности вследствие летальной агрессии были несколько ниже — они находились на уровне 0.6% общей численности животных в социальных группах. Тем не менее, отсутствовали достоверные межвидовые различия в доле ежегодно погибающих в социальных группах от последствий летальной агрессии обезьян разных видов (макаки резусы—макаки яванские,  $p = 0.85$ ; макаки резусы—макаки лапундеры,  $p = 0.06$ ; макаки резусы—мартышки зеленые,  $p = 0.15$ ; макаки резусы—павианы гамадрилы,  $p = 0.71$ ; макаки резусы—павианы анубисы,  $p = 0.16$ ; макаки яванские—макаки лапундеры,  $p = 0.06$ ; макаки яванские—мартышки зеленые,  $p = 0.20$ ; макаки яванские—павианы гамадрилы,  $p = 0.68$ ; макаки яванские—павианы анубисы,  $p = 0.14$ ; макаки лапундеры—зеленые мартышки,  $p = 0.37$ ; макаки лапундеры—павианы гамадрилы,  $p = 0.09$ ; макаки лапундеры—павианы анубисы,  $p = 0.82$ ; зеленые мартышки—павианы гамадрилы,  $p = 0.12$ ; зеленые мартышки—павианы анубисы,  $p = 0.72$ ; павианы гамадрилы—павианы анубисы,  $p = 0.18$ ).

Вероятность проявления летальной агрессии, в определенной степени, была связана с составом социальных групп. В общей сложности за 10 лет наблюдений жертвами агрессии других самцов в самцовых группах стали 39 животных, включая 23 макака резуса, 12 макаков яванских, 2 зеленые мартышки и 2 павиана гамадрила. На рис. 2 показаны средние ежегодные значения доли жертв летальной агрессии в самцовых группах, подсчитанные, исходя из ежегодного количества жертв и среднего ежегодного количества особей в таких группах.

Как видно из рис. 2, имеются достигающие достоверного уровня различия в показателях смертности от летальной агрессии в самцовых группах 4 видов обезьян. Самые низкие показатели смертности от травм, полученных вследствие проявлений агрессии другими членами группы, отмечены в самцовых группах павианов гамадрилов (павианы гамадрилы—макаки резусы,  $p < 0.05$ ; павианы гамадрилы—макаки яванские,  $p = 0.09$ ; павианы гамадрилы—зеленые мартышки,  $p = 0.84$ ), самые

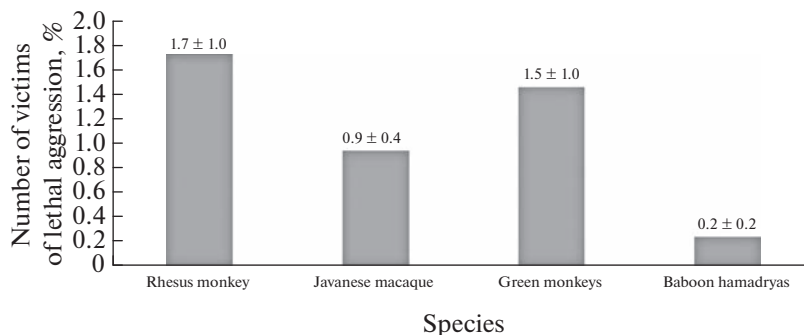


Рис. 2. Средний ежегодный процент жертв летальной агрессии в самцовых группах.

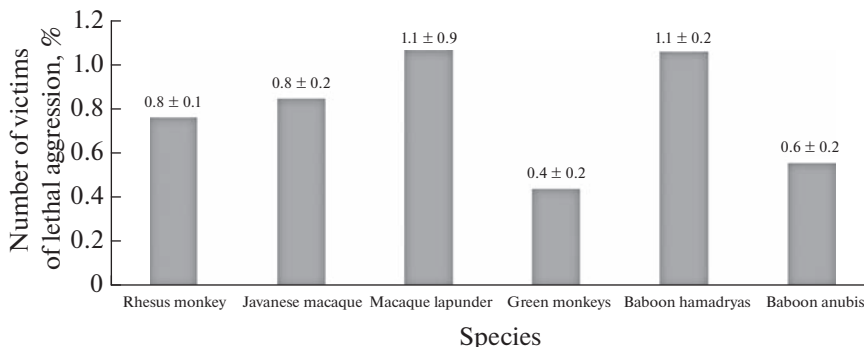


Рис. 3. Средний ежегодный процент жертв летальной агрессии в семейных группах.

высокие — в самцовых группах макаков резусов. Сопоставимо с макаками резусами высокие показатели смертности самцов от летальной агрессии в самцовых группах обнаруживают мартышки зеленые ( $p = 0.18$ ) и макаки яванские ( $p = 0.19$ ).

В семейных группах обезьян питомника за 10-летний период времени было зафиксировано в общей сложности 263 случая нанесения смертельной травмы особям, включая 91 случай у макаков резусов, 89 случаев у павианов гамадрилов, 59 случаев в группах макаков яванских, 13 случаев в группах павианов анубисов, соответственно 6 и 5 случаев в группах макаков лапундеров и зеленых мартышек. Анализ средней ежегодной доли жертв летальной агрессии в семейных группах, подсчитанной, исходя из общего количества особей в таких группах, показал следующее (рис. 3).

Самый высокий и сопоставимый ( $p = 0.09$ ) процент жертв летальной агрессии в семейных группах был отмечен в этот период времени у павианов гамадрилов и макаков лапундеров. Умеренно высокий и сопоставимый процент особей, погибающих ежегодно от летальной агрессии в семейных группах, демонстрировали макаки резусы и макаки яванские ( $p = 0.79$ ). Самые низкие показатели смертности вследствие травм, нанесенных жертвам в семейных группах, отмечены у мартышек зеленых (мартышки зеленые—макаки резусы,  $p = 0.26$ ; мартышки зеленые—макаки яванские,  $p = 0.06$ ; мартышки зеленые—макаки лапундеры,  $p = 0.39$ ; мартышки зеленые—павианы гамадрилы,  $p = 0.13$ ) и у павианов анубисов (павианы анубисы—мака-

**Таблица 1.** Половозрастная структура жертв летальной агрессии в семейных группах обезьян (%)

| Возраст        | % в общем числе жертв и соотношение полов | Вид           |                 |                  |                  |                   |                 |
|----------------|-------------------------------------------|---------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-----------------|
|                |                                           | макаки резусы | макаки яванские | макаки лапундеры | мартышки зеленые | павианы гамадрилы | павианы анубисы |
| До 1 года      | % в общем числе жертв                     | 15.9          | 26.6            | 71.4             | 28.6             | 78/6              | 78.6            |
|                | Самцы/самки                               | 1/0.64        | 1/1.12          | 1/0.67           | 1/1              | 1/0.55            | 1/1.20          |
| 1–3 года       | % в общем числе жертв                     | 9.7           | 14.1            | 14.3             | 28.6             | 2.2               | Нет данных      |
|                | Самцы/самки                               | 1/0.57        | 1/1.25          | 0/1.00           | 0/2.00           | 1/1.00            | Нет данных      |
| 3–7 лет        | % в общем числе жертв                     | 30.1          | 20.3            | Нет данных       | 42.9             | 10.1              | 7.1             |
|                | Самцы/самки                               | 1/1.27        | 1/12.00         | Нет данных       | 1/2.00           | 1/3.50            | 0/1.00          |
| 7 лет и старше | % в общем числе жертв                     | 44.2          | 39.1            | 14.3             | Нет данных       | 9.0               | 14.3            |
|                | Самцы/самки                               | 1/2.85        | 1/11.5          | 0/1.0            | Нет данных       | 1/7.0             | 0/1.0           |
| Всего          | Самцы/самки                               | 1/1.26        | 1/3.27          | 1/1.33           | 1/2.50           | 1/0.81            | 1/2.50          |

ки резусы,  $p = 0.30$ ; павианы анубисы—макаки яванские,  $p = 0.18$ ; павианы анубисы—павианы гамадрилы,  $p = 0.15$ ). Тем не менее, достоверного уровня межвидовые различия достигают только в показателях павианов анубисов и макаков лапундеров ( $p < 0.05$ ). При этом ежегодные значения доли жертв летальной агрессии в семейных группах мартышек зеленых и павианов анубисов существенно не отличаются ( $p = 0.71$ ).

Сравнение процента особей, погибающих ежегодно вследствие летальной агрессии в самцовых и в семейных группах, показывает, что у макаков резусов, макаков яванских и мартышек зеленых в самцовых группах он выше, чем в семейных группах, хотя различия недостоверны (макаки резусы,  $p = 0.97$ ; макаки яванские,  $p = 0.56$ ; мартышки зеленые,  $p = 0.39$ ). Напротив, у павианов гамадрилов процент особей, погибающих ежегодно в результате внутригрупповой летальной агрессии, в семейных группах достоверно выше, чем в самцовых группах ( $p < 0.01$ ).

В табл. 1 показана доля жертв различного возраста, показанная в процентах к общему числу жертв данного вида в семейных группах, а также отношение числа самок, приходящихся на одного самца среди жертв разных возрастных категорий.

Как видно из табл. 1, чаще всего жертвами летальной агрессии в семейных группах макаков резусов и макаков яванских становились взрослые животные старше 7 лет. Число жертв старше 7-летнего возраста в семейных группах макаков резусов было достоверно больше, чем число погибших от летальной агрессии детенышей ( $p < 0.01$ ) и число подростков 1–3-летнего возраста ( $p < 0.001$ ). У макаков яванских животные старше 7 лет также чаще погибали по сравнению с детенышами ( $p = 0.31$ ) и достоверно чаще погибали в результате летальной агрессии по сравнению с подростками 1–3-летнего возраста ( $p < 0.05$ ). У мартышек зеленых наибольшее количество жертв летальной агрессии было отмечено среди животных возрастной категории 3–7 лет. У павианов гамадрилов, павианов анубисов и макаков лапундеров, чаще всего по сравнению с другими возрастными категориями, жертвами летальной агрессии в группах становились детеныши первого года жизни (павианы гамадрилы: детеныши до 1 года—подростки 1–3 лет,  $p < 0.001$ ; детеныши до 1 года—животные 3–7 лет,  $p < 0.001$ ; детеныши 1-го года—животные старше 7 лет,  $p < 0.01$ ; павианы анубисы: детеныши до 1 года—подростки 1–3 лет,  $p < 0.05$ ; детеныши до 1 года—животные 3–7 лет,  $p = 0.11$ ; детеныши 1-го года—животные старше 7 лет,  $p = 0.24$ ; макаки лапундеры: детеныши до 1 года—подростки 1–3 лет,  $p = 0.36$ ; детеныши до 1 года—животные 3–7 лет,  $p = 0.36$ ; детеныши 1-го года—животные старше 7 лет,  $p = 0.67$ ).

Установлено, что детеныши первого года жизни составили достоверно меньшую часть жертв летальной агрессии у макаков резусов ( $p < 0.01$ ) и макаков яванских ( $p < 0.05$ ) и меньшую часть жертв летальной агрессии у мартышек зеленых ( $p = 0.18$ ). При этом у павианов гамадрилов, павианов анубисов и макаков лапундеров детеныши первого года жизни составили большую часть жертв летальной агрессии (павианы гамадрилы,  $p < 0.01$ ; павианы анубисы,  $p = 0.42$ ; макаки лапундеры,  $p = 0.07$ ). Следовательно, преимущественным типом летальной агрессии у этих трех видов обезьян является инфантицид.

Высокая частота инфантицида в группах павианов гамадрилов обеспечивает более высокие показатели летальной агрессии в семейных группах этих обезьян по сравнению с самцовыми группами. Так, из 89 случаев летальной агрессии, отмеченных в семейных группах павианов гамадрилов, в 70 случаях жертвами были детеныши, не достигшие годовалого возраста.

Следует отметить, что в семейных группах макаков резусов и макаков яванских реже всего жертвами летальной агрессии становились ювенильные животные 1–3-летнего возраста. Число таких жертв у макаков резусов было достоверно меньше, чем число жертв 3–7-летнего возраста ( $p < 0.05$ ). У макаков яванских подростки 1–3-летнего возраста достоверно реже становились жертвами летальной агрессии, чем взрослые животные возрастной категории 7 лет и старше ( $p < 0.05$ ).

Анализ половозрастной структуры жертв летальной агрессии (табл. 1) обнаруживает также определенные различия в гендерной принадлежности жертв у разных видов обезьян. За исключением павианов гамадрилов, у пяти остальных видов обезьян среди жертв летальной агрессии в целом преобладают самки (макаки резусы,  $p = 0.22$ ; макаки яванские,  $p < 0.05$ ; макаки лапундеры,  $p = 0.38$ ; мартышки зеленые,  $p = 0.32$ ; павианы анубисы,  $p = 0.58$ ). У павианов гамадрилов среди жертв летальной агрессии преобладают самцы ( $p = 0.32$ ). Из 70 детенышей, умерщвленных гамадрилами в своих группах за 10-летний период, было только 25 самок. При этом у всех 6 видов имеются определенные различия среди разных возрастных категорий. Так, среди жертв — детенышей макаков резусов, макаков лапундеров и павианов гамадрилов преобладают самцы (макаки резусы,  $p = 0.29$ ; макаки лапундеры,  $p = 0.10$ ; павианы гамадрилы,  $p = 0.06$ ), тогда как у макаков яванских, зеленых мартышек и павианов анубисов число самцов и самок среди детенышей — жертв летальной агрессии сопоставимо (макаки яванские,  $p = 0.58$ ; зеленые мартышки,  $p = 1.00$ ; павианы анубисы,  $p = 0.76$ ). Среди подростков 1–3 лет самцы составляют большую часть жертв только у макаков резусов ( $p = 0.46$ ). Практически у всех видов обезьян более старших возрастных категорий среди жертв летальной агрессии отмечается преобладание самок (жертвы 3–7 лет: макаки резусы,  $p = 0.90$ ; макаки яванские,  $p < 0.05$ ; мартышки зеленые,  $p = 0.58$ ; павианы гамадрилы,  $p = 0.25$ ; павианы анубисы,  $p = 0.36$ ; жертвы старше 7 лет: макаки резусы,  $p < 0.01$ ; макаки яванские,  $p < 0.01$ ; макаки лапундеры,  $p = 0.16$ ; павианы гамадрилы,  $p = 0.06$ ; павианы анубисы,  $p = 0.56$ ).

В табл. 2–5 показано в процентах число случаев летальной агрессии, направленных на жертв разного возраста и рассмотренных в зависимости от того, являлись ли данные случаи результатом коллективных действий нескольких самцов, нескольких самок или же совершались единичными особями.

В целом, у всех видов обезьян, рассмотренных в совокупности, агрессивные действия, приводящие к смерти детенышей, в 91% случаев совершали одиночные самцы. Самцовый инфантицид, то есть, агрессивные действия одного самца, являлся ведущей причиной гибели от летальной агрессии детенышей, не достигших годовалого возраста, у всех 6 видов исследованных обезьян. У павианов гамадрилов и павианов анубисов одиночные самцы являлись агрессорами в достоверно большем числе случаев летальной агрессии, демонстрируемой в семейных группах по отношению к детенышам (павианы гамадрилы,  $p < 0.001$ ; павианы анубисы,  $p < 0.05$ ).

**Таблица 2.** Агрессоры, осуществлявшие летальную агрессию по отношению к детенышам, не достигшим годовалого возраста

| Агрессоры<br>Виды | Одна особь |       | Несколько особей |       |
|-------------------|------------|-------|------------------|-------|
|                   | самец      | самка | самцы            | самки |
| Макаки резусы     | 63.6       | 9.1   | 0                | 27.3  |
| Макаки яванские   | 85.7       | 7.1   | 0                | 7.1   |
| Макаки лапундеры  | 100.0      | 0     | 0                | 0     |
| Мартышки зеленые  | 100.0      | 0     | 0                | 0     |
| Павианы гамадрилы | 95.4       | 1.5   | 3.0              | 0     |
| Павианы анубисы   | 100.0      | 0     | 0                | 0     |

В таблице приведено число случаев летальной агрессии, выраженное в процентах.

**Таблица 3.** Агрессоры, осуществлявшие летальную агрессию по отношению к подросткам 1–3 лет

| Агрессоры<br>Виды | Одна особь |       | Несколько особей |       |
|-------------------|------------|-------|------------------|-------|
|                   | самец      | самка | самцы            | самки |
| Макаки резусы     | 27.3       | 18.2  | 18.2             | 36.4  |
| Макаки яванские   | 12.5       | 0     | 50.0             | 37.5  |
| Макаки лапундеры  | 0          | 0     | 0                | 100.0 |
| Мартышки зеленые  | 100.0      | 0     | 0                | 0     |
| Павианы гамадрилы | 100.0      | 0     | 0                | 0     |
| Павианы анубисы   | 0          | 0     | 0                | 0     |

В таблице приведено число случаев летальной агрессии, выраженное в процентах.

У макаков лапундеров, макаков резусов, макаков яванских и зеленых мартышек одиночные самцы также являлись агрессорами, демонстрировавшими летальную агрессию по отношению к детенышам, в большем числе таких случаев (макаки лапундеры,  $p = 0.37$ ; макаки резусы,  $p = 0.58$ ; макаки яванские,  $p = 0.06$ ; зеленые мартышки,  $p = 0.16$ ). Кроме самцов, поведение, которое необходимо оценивать как инфантицид, в единичных случаях демонстрировали самки. За 10 лет исследования в семейных группах макаков резусов, макаков яванских и павианов гамадрилов было отмечено по одному случаю демонстрируемой отдельной самкой летальной агрессии, направленной на детеныша другой самки.

Коллективная агрессия, приводившая к гибели детенышей, также отмечалась у макаков резусов, макаков яванских и павианов гамадрилов. У макаков резусов и макаков яванских из числа случаев, когда жертвами летальной агрессии были детеныши, соответственно в 2 и в 1 случаях, агрессорами являлись одновременно несколько самок. У павианов гамадрилов в двух случаях детеныши погибали от последовательных действий 2 самцов.

В табл. 3 в процентах показано количество случаев, рассмотренных в зависимости от того, кто являлся агрессором при проявлении летальной агрессии, направленной на ювенильных особей.

Несмотря на общую относительную немногочисленность случаев летальной агрессии, направленной на подростков в группах, сравнение действий агрессоров обнаруживает определенные межвидовые различия. У макаков резусов и особенно у макаков яванских летальная агрессия, приводящая к смерти особей ювенильного

**Таблица 4.** Агрессоры, осуществлявшие летальную агрессию по отношению к жертвам 3–7-летнего возраста

| Агрессоры<br>Виды | Одна особь |       | Несколько особей |       |
|-------------------|------------|-------|------------------|-------|
|                   | самец      | самка | самцы            | самки |
| Макаки резусы     | 14.3       | 0     | 39.3             | 46.4  |
| Макаки яванские   | 11.8       | 0     | 23.5             | 64.7  |
| Макаки лапундеры  | 0          | 0     | 0                | 0     |
| Мартышки зеленые  | 50.0       | 0     | 0                | 50.0  |
| Павианы гамадрилы | 88.9       | 0     | 11.1             | 0     |
| Павианы анубисы   | 100.0      | 0     | 0                | 0     |

В таблице приведено число случаев летальной агрессии, выраженное в процентах.

**Таблица 5.** Агрессоры, осуществлявшие летальную агрессию по отношению к взрослым жертвам 7 лет и старше

| Агрессоры<br>Виды | Одна особь |       | Несколько особей |       |
|-------------------|------------|-------|------------------|-------|
|                   | самец      | самка | самцы            | самки |
| Макаки резусы     | 13.6       | 2.3   | 15.9             | 68.2  |
| Макаки яванские   | 3.8        | 0     | 19.2             | 76.9  |
| Макаки лапундеры  | 100.0      | 0     | 0                | 0     |
| Мартышки зеленые  | 0          | 0     | 0                | 0     |
| Павианы гамадрилы | 87.5       | 0     | 0                | 12.5  |
| Павианы анубисы   | 100.0      | 0     | 0                | 0     |

В таблице приведено число случаев летальной агрессии, выраженное в процентах.

возраста, в большем числе случаев выступает в форме коллективных действий агрессоров — самцов или самок (макаки резусы,  $p = 0.14$ ; макаки яванские,  $p = 0.06$ ).

Действия агрессоров по отношению к молодым особям 3–7-летнего возраста (табл. 4) также обнаруживают выраженную видовую специфику. У макаков яванских к смерти жертв такого возраста в большинстве случаев приводят коллективные действия других членов группы ( $p = 0.12$ ), чаще самок ( $p = 0.12$ ). У макаков резусов жертвы 3–7-летнего возраста достоверно чаще погибали также в результате коллективных действий других особей группы ( $p < 0.05$ ). У павианов гамадрилов и павианов анубисов коллективная агрессия по отношению к особям 3–7-летнего возраста является редкостью, а агрессором, совершающим действия, приводящие к гибели жертвы, обычно является один взрослый самец (павианы гамадрилы,  $p = 0.12$ ). Практически такая же видовая специфика характерна для случаев летальной агрессии, отмеченной в семейных группах обезьян по отношению к взрослым жертвам старше 7-летнего возраста (табл. 5).

У макаков резусов и макаков яванских в достоверном большинстве случаев агрессорами, осуществляющими завершающиеся гибелью жертвы нападения на взрослых членов своей группы, являлось несколько взрослых самок (макаки резусы,  $p < 0.05$ ; макаки яванские,  $p < 0.05$ ). В семейных группах мартышек зеленых случаев летальной агрессии по отношению к взрослым жертвам в изучавшийся период времени не отмечалось. У павианов гамадрилов в большинстве случаев проявлений летальной агрессии по отношению к взрослым животным, агрессивные действия совершал один взрослый самец ( $p = 0.13$ ), и только в одном случае агрес-

сорами по отношению к самке своей группы оказались другие самки этой группы. У павианов анубисов в обоих отмеченных случаях летальной агрессии, направленной на взрослых животных, агрессором был одиночный самец, а жертвой — самка.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, проведенный анализ случаев летальной агрессии у содержащихся социальными группами обезьян показал, что подобные проявления в условиях неволи отмечаются, причем с довольно высокой частотой, у всех шести изучавшихся видов — макаков резусов, макаков яванских, макаков лапундеров, зеленых мартышек, павианов гамадрилов и павианов анубисов. Факт обнаружения этого явления у различных представителей семейства мартышковых обезьян (*Cercopithecidae*) позволяет рассматривать внутривидовую и внутригрупповую летальную агрессию как общее свойство обезьян этого семейства. Этот вывод хорошо согласуется с многочисленными наблюдениями случаев летальной агрессии в группах мартышковых обезьян, выполненных исследователями как в условиях естественного обитания, так и в неволе [7, 20, 22, 27, 28, 31].

К числу наиболее важных заключений, которые можно сделать на основании полученных в исследовании результатов, следует отнести наличие выраженной видовой специфики в проявлениях летальной агрессии. Анализ возраста и пола жертв, пола агрессоров и отсутствие либо наличие коллективности в их действиях позволяет достаточно уверенно разделить изученные виды обезьян на две категории. К первой из них следует отнести павианов гамадрилов, павианов анубисов и макаков лапундеров, у которых преобладающей формой летальной агрессии является самцовый инфантицид, то есть убийство детенышей, совершающееся преимущественно одиночными самцами. Случаи убийства взрослых обезьян для животных этих видов нехарактерны и отмечаются редко, так же как и коллективная агрессия. Также редко отмечаются проявления летальной агрессии самок. Оценивая эту категорию обезьян, следует отметить такие общие для этих трех видов особенности как сильно выраженный половой диморфизм в размерах тела и в социальном статусе. Самцы павианов гамадрилов, павианов анубисов и макаков лапундеров значительно превосходят самок в размерах тела и положению в иерархии. При этом для павианов гамадрилов характерны 4 уровневость, патрилинейность и гаремное устройство социальной структуры. У павианов анубисов, так же, как и у макаков лапундеров, мультисамцовая социальная структура, нет выраженного деления на гаремы.

Самцовый инфантицид, то есть нанесение смертельных травм детенышам, является формой летальной агрессии, описанной у многих видов приматов [22–24]. В наших условиях самцовый инфантицид с наибольшей, по сравнению с другими видами обезьян частотой, отмечался в группах павианов гамадрилов. Учитывая существование многочисленных описаний случаев инфантицида у павианов гамадрилов [25–27], можно рассматривать его проявления как характерную особенность поведения взрослых самцов у этого вида обезьян, проявляющуюся в определенных условиях, прежде всего при смене лидера группы. Обращает на себя внимание впервые обнаруженный нами факт преимущественного убийства детенышей самцов. Случаи самцового инфантицида в наших условиях были характерны также для павианов анубисов и макаков лапундеров, но отмечались с меньшей частотой, чем у павианов гамадрилов. Кроме того, отмечены были случаи убийства взрослым самцом детенышей в группах макаков яванских. Случаи самцового инфантицида у макаков резусов и зеленых мартышек отмечались редко, но, тем не менее, имели место и являлись основной причиной гибели от полученных травм для детенышей этих обезьян.

Существуют несколько гипотез, объясняющих механизм самцового инфантицида у обезьян. Согласно гипотезе полового отбора [28], самец-киллер уничтожает потомство других самцов, повышая, тем самым, шансы на выживание своего потомства. Согласно другим точкам зрения, убийство детенышей либо является следствием патологического поведения самцов, проявляющегося, преимущественно, в условиях неволи [29, 30], либо рассматривается как результат переадресации агрессии с взрослых членов группы на детенышей в условиях нестабильности в группе [31].

В сообществах павианов гамадрилов, павианов анубисов и макаков лапундеров взрослые самцы занимают лидирующую позицию в группах, доминируя над самками и молодыми животными. Этому способствует выраженный половой диморфизм в размерах тела этих обезьян, в соответствии с которым взрослые самцы значительно крупнее самок. Учитывая то, что самцы этих видов демонстрируют летальную агрессию практически только по отношению к детенышам, крайне редко делая это по отношению к подросткам, молодым и взрослым самцам и самкам, не следует, по-видимому, оценивать самцовый инфантицид как проявления патологии поведения. Целенаправленные действия самцов в отношении детенышей могут рассматриваться, прежде всего, как форма демонстрации высокого статуса самца, способствующая утверждению его лидерства. Захватывая детенышей, то есть тех членов группы, которые в сообществе павианов наиболее привлекательны как объект внимания для взрослых особей, и, осуществляя перенос агрессии с взрослых животных на детенышей, самец обеспечивает себя необходимыми в его социальной жизни возможностями управлять поведением самок. При этом преимущественный захват детенышей самцов может быть вызван тем, что по нашим многолетним наблюдениям за свободноживущими обезьянами [32], у павианов гамадрилов детеныши-самцы более привлекательны, чем детеныши-самки, как для самок матерей, так и для других членов группы. Положительным аспектом контролирующей функции поведения самцов по отношению к самкам можно считать то, что именно самцы своим контролирующим поведением обеспечивают свойственный этим видам низкий уровень летальной агрессии самок.

В отличие от павианов гамадрилов, павианов анубисов и макаков лапундеров жертвами летальной агрессии у макаков резусов, макаков яванских и зеленых мартышек в основном являются почти взрослые и взрослые особи группы. Случаи самцового инфантицида у этих обезьян имеют место быть, но отмечаются со сравнительно небольшой частотой. Этот факт позволяет выделить макаков резусов, макаков яванских и зеленых мартышек в категорию, для которой преимущественно характерна летальная агрессия, не являющаяся, как у павианов, формой демонстрации на детенышах своих агрессивных возможностей, а представляющая собой непосредственное и жесткое проявление отношений взрослых особей. Об этом свидетельствует, в частности, очень высокий уровень летальной агрессии в самцовых группах обезьян этой категории, несопоставимо более высокий, чем в самцовых группах павианов гамадрилов. При этом в семейных группах макаков резусов, макаков яванских и зеленых мартышек летальная агрессия характеризуется высоким процентом самок как среди жертв, так и среди агрессоров, так же, как и высоким уровнем коллективной агрессии. Следует отметить, что у макаков яванских, и особенно у макаков резусов и зеленых мартышек половой диморфизм в размерах тела самцов и самок выражен значительно слабее, а положение самцов в иерархии группы сопоставимо с положением самок. Социальная структура макаков резусов, макаков яванских и мартышек зеленых характеризуется выраженной матрилинейностью. Положение каждой особи в иерархии особей группы у этих видов сравнительно слабо связано с полом и определяется, прежде всего, принадлежностью к определенной матрилинии. Чаще всего летальная агрессия у этих обезьян пред-

ставляет собой внешнее проявление борьбы матрилиний за лидерство, которое осуществляется совместными агрессивными действиями особей [33]. При этом также может происходить перенос агрессии на детеныша самки, являющейся объектом агрессии в этих отношениях, хотя основной целью обычно является собственнo мать детеныша. В некоторых случаях отмечаются совместные действия членов группы по отношению к новым членам группы, претендующим на высокое место в иерархии, например, при интродукции новых самцов в группу самок со сложившимися устойчивыми отношениями.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с международными правилами по использованию лабораторных животных [34]. На проведение исследования было получено разрешение Комиссии по этике Научно-исследовательского института медицинской приматологии.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась в рамках плановой научной темы “Комплексное исследование поведенческих, когнитивных и биохимических показателей обезьян. Сохранение и расширение коллекции лабораторных приматов с целью моделирования социально-значимых заболеваний человека и оценки качества препаратов”.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов при публикации данного исследования отсутствует.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и планирование работы: В.Г.Ч., Н.В.М. Сбор данных: Н.В.М., И.Г.П., Е.Н.А., Д.В.З. Обработка данных: Н.В.М., И.Г.П., Е.Н.А., Д.В.З. Написание и редактирование манускрипта: В.Г.Ч., Н.В.М., И.Г.П., Е.Н.А.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gomez J, Verdu M, Gonzales-Megias A, Mendez M (2016) The phylogenetic roots of human lethal violence. *Nature* 538(7624): 233–237.  
<https://doi.org/10.1038/nature19758>
2. Macfarland S, Walker R, Flinn M (2014) Lethal coalitionary aggression and long-term alliance formation among Yamomomo men. *PNAS* 111(47): 16662–16669.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1418639111>
3. Itani J (1982) Intraspecific killing among non-human primates. *J Social and Biol Struct* 5(4): 361–368.
4. Gros-Louis J, Perry S, Manson J (2003) Violent coalitionary attacks and intraspecific killing in wild white-faced capuchin monkeys (*Cebus capucinus*). *Primates* 44: 341–346.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10329-003-0050-z>
5. Talebi M, Bertrao-Mendez R, Lee P (2009) Intra-Community Coalitionary Lethal attack of an Adult Male Southern Muriqui (*Brachyteles arachnoides*). *Am J Primatol* 71: 860–867.  
<https://doi.org/10.1002/ajp.20713>
6. Valero A, Schaffner C, Vick L, Aurell F, Ramos-Fernandez G (2006) Intragroup Lethal Aggression in Wild Spider Monkeys. *Am J Primatol* 68: 732–737.  
<https://doi.org/10.1002/ajp.20263>
7. Charpentier J, Drea M (2013) Victims of Infanticide and Conspecific Bite Wounding in a Female-Dominant Primate: A Long-Term Study. *PLoS One* 8(12): e82830.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082830>
8. Davis N, Schaffner C, Wehnelt S (2009) Patterns of injury in zoo-housed spider monkeys: A problems with males? *Appl Animal Behav Sci* 116: 250–259.  
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.08.008>
9. Williams J, Lonsdorf E, Wilson M, Schumacher-Stankey J, Goodall J, Pusey A (2008) Causes of Death in the Kasekela Chimpanzees of Gombe National Park, Tanzania. *Am J Primatol* 70(8):

- 766–777.  
<https://doi.org/10.1002/ajp.20573>
10. Kaburu S, Inoue S, Newton-Fisher N (2013) Death of the Alpha: Within-Community Lethal Violence Among Chimpanzees of the Mahale Mountains National Park. *Am J Primatol* 75(8): 789–797.  
<https://doi.org/10.1002/ajp.22135>
11. Sandel A, Watts D (2021) Lethal Coalitional Aggression Associated with a Community Fission in Chimpanzees (*Pan troglodytes*) at Ngogo, Kibale National Park, Uganda. *Int J Primatol* 42(1): 26–48.  
<https://doi.org/10.1007/s10764-020-00185-0>
12. Wilson M, Boesch Chr, Fruth B, Furuichi T, Gilby J (2014) Lethal aggression in Pan is better explained by adaptive strategies than human impacts. *Nature* 513: 414–417.  
<https://doi.org/10.1038/nature13727>
13. Kittler K, Dietzel S (2016) Female infanticide and female-directed lethal targeted aggression in a group of ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *Primate Biol* 3: 41–46.  
<https://doi.org/10.5194/pb-3-41-2016>
14. Buhl J, Bonn A, Ruiz-Lambides A, Gonzalez-Martinez J, Platt M, Brent L (2012) Response of rhesus Macaques (*Macaca mulatta*) to the Body of a Group Member that Died from a Fatal Attack. *Int J Primatol* 33(4): 860–871.  
<https://doi.org/10.1007/s10764-9624-1>
15. Rosenbaum S, Vecellio V, Stoinski T (2016) Observations of severe and lethal coalitional attacks in wild mountain gorilla. *Scient Rep* 6: 37018.  
<https://doi.org/10.1038/srep37018>
16. Palombit R (1993) Lethal territorial aggression in a white-handed gibbon. *Am J Primatol* 31(4): 311–318.  
<https://doi.org/10.1002/ajp.1350310407>
17. Marzec A, Kunz J, Falkner S, Atmoko S, Alavi Sh, Moldawer A, Vogel E, Schuppli C, van Schaik C, van Noordwijk M (2016) The dark side of the red ape: male-mediated lethal female competition in Bornean orangutans. *Behav Ecol Sociobiol* 70: 459–466.  
<https://doi.org/10.1007/s00265-015-2053-3>
18. Wrangham R, Wilson M, Muller M (2006) Comparative rates of violence in Chimpanzees and humans. *Primates* 46: 14–26.  
<https://doi.org/10.1007/s103329-005-0140-1>
19. Pruett J, Ontl K, Cleveland E, Lindshield S, Marshack J, Wessling E (2017) Intragroup Lethal Aggression in West African Chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): Inferred Killing of a Former Alpha Male at Fongoli, Senegal. *Int J Primatol* 58: 31–57.  
<https://doi.org/10.1007/s10764-016-9942-9>
20. Judge P, de Waal F, Paul K, Gordon Th (1994) Removal of a Trauma-Inflicting Alpha Matriline from a Group of Rhesus Macaques to Control Severe Wounding. *Lab Animal Sci* 44(4): 344–350.
21. Pusey A, Murray C, Wallaner W, Wilson M, Wroblewski E, Goodall J (2008) Severe Aggression Among Female Pan Troglodytes schweinfurthii at Gombe National Park, Tanzania. *Int J Primatol* 29: 949–973.  
<https://doi.org/10.1007/s10764-008-9281-6>
22. Beehner J, Bergman Th (2008) Infant Mortality Following Male Takeovers in Wild Geladas. *Am J Primatol* 70: 1152–1159.  
<https://doi.org/10.1002/ajp.20614>
23. Robbins A, Gray M, Basabose A, Uwingeli P, Mburanumwe I, Kagoda E, Robbins M (2013). Impact of Male Infanticide on the Social Structure of Mountain Gorillas. *PLoS One* 8(11): e78256.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078256>
24. Yao H, Yu H, Yang B, Yang W, Xu H, Grueter C, Li M, Xiang Z (2016) Male Infanticide in the Golden Monkey (*Rhinopithecus roxellana*), a Seasonally Breeding Primate. *Int J Primatol* 37: 175–184.  
<https://doi.org/10.1007/s10764-016-9892-2>
25. Чалян В, Меишвили Н (1990) Инфантицид у павианов гамадрилов. *Биол науки* 3: 99–106. [Chalyan M, Meishvili T (1990) Infanticide among Hamadryas baboons. *Biol Sci* 3: 99–106. (In Russ)].
26. Zinner D, Kaumanns W, Rohruher B (1993) Infant mortality in captive Hamadryas baboons (*Papio hamadryas*). *Primate Rep* 36: 97–111.
27. Swedell L, Tesfaye T (2003) Infant Mortality After Takeovers in Wild Ethiopian Hamadryas Baboons. *Am J Primatol* 60: 113–118.  
<https://doi.org/10.1002/ajp.10096>
28. Hrdy S (1979) Infanticide among animals: A review classification and examination of the implications for the reproductive strategies of females. *Ethol and Sociobiol* 1: 13–40.

29. Boggess J (1979) Troop male membership changes and infant killing in langurs (*Presbytis entellus*). *Folia Primatol* 32: 67–107.
30. Dolhinov P (1977) Normal monkeys? *Am Sci* 65: 266.
31. Bartlett T, Sussman R, Cheverud J (1993) Infant killing in primates: a review of observed cases with specific reference to the sexual selection hypothesis. *Am J Antropol* 95: 958–990.
32. Чалян В, Мейшвили Н (2019). Павианы гамадрилы в лесах Черноморского побережья Кавказа. Дом ЯСК. Москва. [Chalyan V, Meishvili N (2019) Hamadryas baboons in the Subtropical Forest of the Coast of Black Sea. Pub Home ASK. Moscow. (In Russ)].
33. Samuels A, Henrickson R (1983) Outbreak of severe aggression in captive *Macaca mulatta*. *Am J Primatol* 5: 277–281.
34. National Research Council (2010) Guide for the care and use of Laboratory animals. Nat Acad Press.

### Lethal Aggression in Captive Monkeys

V. G. Chalyan<sup>a</sup>, N. V. Meishvili<sup>a</sup>\*, I. G. Pachulia<sup>a</sup>, E. N. Anikaeva<sup>a</sup>, and D. V. Zadorojnii<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Scientific Research Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia

\*e-mail: natela\_prim@list.ru

Establishing the characteristics of monkey lethal aggression, assessing the age and sex of aggressors and victims, and the nature of the aggressors' actions seems necessary to identify the evolutionary roots of cases of human lethal aggression. In addition, the study of the features of lethal aggression can be considered as a condition for the development of measures aimed at preventing its manifestations in captive monkeys. The aim of the study is to study the species-specific features of lethal aggression in captive macaques, baboons and guenons. An analysis was made of cases of intra-group lethal aggression that occurred over a 10-year period in Rhesus macaques (*Macaca mulatta*), Crab-eating macaques (*Macaca fascicularis*), Pig-tail macaques (*Macaca nemestrina*), Green monkeys (*Chlorocebus aethiops*), Hamadryas baboons (*Papio hamadryas*), Anubis baboons (*Papio anubis*) kept by social groups. It has been established that cases of lethal aggression are observed in all 6 studied species of monkeys. It was shown that in groups consisting of adult males, the highest frequency of cases of lethal aggression was noted in Rhesus macaques, and the lowest in Hamadryas baboons. Species-specific differences were found in the nature of lethal aggression in monkey family groups consisting of males, females, infants, and adolescents. It has been established that in Hamadryas baboons, Anubis baboons and Pig-tail macaques, that is, in species with pronounced sexual dimorphism in body size and social status, the main form of lethal aggression in family groups is infanticide committed by a single sexually mature male. In Rhesus monkeys, Crab-eating macaques and Green monkeys, that is, those species that are characterized by relatively mild sexual dimorphism in body size and social status, the predominant form of lethal aggression in family groups is the collective actions of females aimed at young and adult members of the group.

**Keywords:** baboons, macaques, monkeys, lethal aggression, infanticide, aggressors, victims

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА НА СПАЙКОВУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ  
СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ  
АФФЕРЕНТНЫХ ВХОДОВ ИЗ АРКУАТНОГО ЯДРА КРЫС**

© 2023 г. А. Н. Инюшкин<sup>1</sup>, \*, К. А. Мистрюгов<sup>2</sup>, О. В. Ледяева<sup>1</sup>, И. Д. Романова<sup>1</sup>,  
Т. С. Исакова<sup>1</sup>, А. А. Инюшкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева,  
Самара, Россия

<sup>2</sup>Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

\*E-mail: ainyushkin@mail.ru

Поступила в редакцию 19.11.2022 г.

После доработки 06.01.2023 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

В экспериментах на сагиттальных срезах гипоталамуса крыс-самцов Вистар изучали влияние 15 нМ инсулина на уровень спайковой активности, параметры спайкового кодирования информации нейронами супрахиазматического ядра и функциональное состояние афферентных входов к этим нейронам из аркуатного ядра. Аппликации инсулина приводили к снижению частоты генерации потенциалов действия и росту энтропии распределения межспайковых интервалов у 33.3% зарегистрированных нейронов, у 12% клеток наблюдались реакции противоположной направленности, показатели спайковой активности остальных 54.7% нейронов не изменялись. Наблюдавшиеся реакции энтропии распределения межспайковых интервалов свидетельствуют о соответствующих изменениях степени нерегулярности межспайковых интервалов под влиянием инсулина. Характеристику афферентных входов к нейронам супрахиазматического ядра из аркуатного ядра производили с помощью электрофизиологической техники построения и анализа перистимульной временной гистограммы. Статистически значимые реакции на стимуляцию аркуатного ядра зарегистрированы у 24 из 38 протестированных нейронов супрахиазматического ядра. Из них у 6 нейронов реакция протекала в виде коротколатентного (<20 мс) возбуждения, у 1 нейрона — в виде длиннолатентного возбуждения, у 6 нейронов — в виде коротколатентного торможения, у 11 нейронов наблюдались комплексные двух- и трехфазные реакции в виде различных сочетаний возбуждения и торможения. Аппликации 15 нМ инсулина вызвали качественное изменение реакций (в виде исчезновения исходных или появления новых реакций) у 5 нейронов, первоначально отвечавших на стимуляцию, и у 1 нейрона, первоначально не отвечавшего на стимуляцию аркуатного ядра. Статистически значимых количественных изменений латентного периода и продолжительности реакций под влиянием инсулина не обнаружено. Полученные результаты указывают на способность инсулина оказывать влияние на уровень активности и спайковый код относительно многочисленной популяции нейронов циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра, а также модулировать функциональное состояние афферентных входов к циркадианному осциллятору из гипоталамического аркуатного ядра, играющего важную роль в регуляции аппетита и метаболизма.

**Ключевые слова:** гипоталамус, циркадианный осциллятор, супрахиазматическое ядро, аркуатное ядро, инсулин, спайковая активность, перистимульная временная гистограмма

**DOI:** 10.31857/S086981392302005X, **EDN:** NDNZUL

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время хорошо известно, что все разнообразие околосуточных ритмов регулируются биологическими часами гипоталамического супрахиазматического ядра, генерирующими собственный эндогенный циркадианный ритм [1, 2]. Однако период ритма супрахиазматического циркадианного осциллятора редко соответствует 24 ч, а потому нуждается в синхронизации с суточным ритмом окружающего мира. Кроме основного, фотического механизма синхронизации [3], в циркадианной системе млекопитающих используются и другие механизмы настройки биологических часов. В частности, роль времязадавателя выполняет информация о режиме питания, составе и калорийности пищи. В рамках данного механизма синхронизации в качестве носителей сигнала используются метаболические и гормональные регуляторы, а биологические часы супрахиазматического ядра регулируют суточный паттерн обмена питательных веществ и энергии [4–6].

Потенциальным регулятором, принимающим участие в синхронизации циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра в соответствии с пищевой мотивацией, является гормон инсулин. Ранее в электрофизиологическом исследовании *in vitro* было показано, что инсулин оказывает преимущественно угнетающее влияние на активность клеток супрахиазматического ядра у крыс [7]. Существенный недостаток этой работы заключался в том, что ее авторы выполнили количественную оценку изменений единственного “традиционного” показателя активности нейронов – средней частоты генерации спайков. Такой подход к характеристике биоэлектрической активности нейронов нельзя считать полным, поскольку многие важные аспекты кодирования информации остаются вне поля зрения. Между тем в нашем исследовании на крысах *in vivo* [8] было продемонстрировано существование в нейронах циркадианного осциллятора суточного ритма показателей спайкового кода. До сих пор возможное влияние инсулина на спайковое кодирование информации нейронами циркадианного осциллятора оставалось неизученным. Вместе с тем известно о способности некоторых гормонов и нейропептидов, участвующих в формировании пищевой мотивации (лептина и нейропептида Y), модулировать параметры спайковой активности клеток супрахиазматического ядра [9, 10].

Поскольку блокада синаптической передачи не препятствовала проявлению влияния инсулина на активность нейронов супрахиазматического ядра [7], есть основания предполагать, что эффекты этого гормона обусловлены в первую очередь его непосредственным воздействием на эти нейроны. Такая возможность хорошо согласуется с данными об экспрессии рецепторов инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в этом ядре [11, 12]. В то же время нельзя исключить существования опосредованного действия этого гормона, определяющегося его возможной модуляцией афферентных входов в супрахиазматическое ядро из других структур. Прежде всего такой структурой может служить расположенное непосредственно каудальнее супрахиазматического ядра аркуатное ядро. Данное ядро, играющее важнейшую роль в регуляции аппетита и метаболизма [13], отвечает за реализацию значительной части центральных эффектов инсулина через инсулиновые и IGF-1 рецепторы [14, 15]. Морфологической основой взаимодействия между клетками аркуатного и супрахиазматического ядер являются реципрокные связи между ними, обнаруженные с использованием электрофизиологических и нейрохимических методов [16–19].

В настоящей работе, выполненной на срезах гипоталамуса крыс, изучены особенности влияния инсулина на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра и осуществлена экспериментальная проверка способности инсулина модулировать функциональное состояние афферентных входов из аркуатного ядра к клеткам супрахиазматического ядра.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 28 крысах-самцах Вистар массой тела 80–140 г. Животных содержали в условиях вивария при режиме освещения в виде регулярной смены 12-часовых светлых и темных периодов и свободном доступе к пище и воде.

В начале эксперимента крыс наркотизировали уретаном (Sigma-Aldrich, США, 1.2 г/кг массы тела внутривенно) и декапитировали. Из полости черепа извлекали головной мозг, быстро охлаждали в искусственной цереброспинальной жидкости при температуре 1–3°C, после чего с помощью вибратора (NVSL, World Precision Instruments, США) готовили сагиттальные срезы гипоталамуса толщиной 300 мкм, включающие супрахиазматическое и аркуатное ядро. Искусственная цереброспинальная жидкость содержала (мМ) 124 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 0.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 глюкозы. После изготовления срезы по меньшей мере в течение часа инкубировали в насыщенном карбогеном (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>) искусственной цереброспинальной жидкости при температуре 37°C до начала регистрации. Для регистрации спайковой активности нейронов срезы переносили в камеру из органического стекла, смонтированную на антивибрационном столике (Vibraplane, США). Камеру перфузировали искусственной цереброспинальной жидкостью, насыщенной карбогеном, с постоянной скоростью 1.5 мл/мин с помощью перистальтической помпы (Minipuls 3, Gilson, Франция). Регистрацию производили при температуре 27–30°C.

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

В первой серии экспериментов регистрировали реакции параметров спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра ( $n = 75$ ) на аппликации 15 нМ инсулина (Актрапид НМ, NOVO NORDISK, Дания) в перфузионный раствор. При выборе используемой концентрации инсулина мы ориентировались на данные о содержании этого вещества в цереброспинальной жидкости крысы [20], а также на сведения об эффективных концентрациях инсулина, ранее использованных при изучении его центральной активности другими исследователями [7, 14, 21–25]. Регистрацию активности нейронов производили в светлое время суток (в период с 10 до 20 ч). После появления спайковой активности в исходном состоянии наблюдали за стабильностью частоты потенциалов действия в течение 10 мин. При отсутствии видимой тенденции к нарушению постоянства этого показателя перфузию меняли на раствор того же состава с добавлением инсулина на 10 мин, а затем возвращались к исходному раствору на 15 мин для отмывания среза от исследуемого вещества. С целью исключения возможной десенситизации, на каждый срез производили однократную аппликацию инсулина.

Процесс обработки данных о спайковой активности был детально описан ранее [10]. Первым этапом обработки было тщательное выделение всех зарегистрированных спайков из шума и артефактов, которое выполнялось с помощью компьютерной программы LabSpike [26]. Использование данной программы, в частности, позволяло удостовериться, что источником всех зарегистрированных спайков является один и тот же нейрон. Наряду с расчетом основного “традиционного” параметра электрической активности нейронов — средней частоты генерации спай-

ков, вычисляли два параметра, характеризующих спайковое кодирование информации: энтропию распределения межспайковых интервалов, характеризующую степень нерегулярности генерации потенциалов действия, и обоюдную информацию между сопряженными межспайковыми интервалами, отражающую паттернирование спайковой информации [8, 26].

Для оценки эффектов инсулина сравнивали значение параметров спайковой активности в течение двух пятиминутных интервалов времени: в исходном состоянии (непосредственно перед аппликацией) и в конце периода аппликации. Нейронами, реагирующими на воздействие инсулина, считались лишь те, у которых частота генерации спайков изменялась под влиянием этого гормона не менее чем на 20% от исходной [27]. Для определения степени восстановления активности нейрона анализировали параметры спайковой активности в течение заключительного пятиминутного периода отмывания среза и сравнивали с исходной активностью (перед аппликацией).

Во второй серии экспериментов изучали способность инсулина модулировать функциональное состояние афферентных входов к нейронам супрахиазматического ядра из гипоталамического аркуатного ядра. Для этого регистрировали реакции спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра ( $n = 38$ ) на электростимуляцию вентромедиальной области аркуатного ядра, нейроны которой являются источником проекций в супрахиазматическое ядро [17]. Для стимуляции использовали биполярный электрод из нержавеющей стали (диаметр 100 мкм, межэлектродное расстояние 200 мкм). Стимуляцию осуществляли единичными двуфазными прямоугольными импульсами с частотой 1 Гц, амплитудой 200 мкА и продолжительностью 1 мс (продолжительность положительной и следующей непосредственно за ней отрицательной фазы была одинакова и составляла 0.5 мс). Генерацию стимулирующих импульсов производили с помощью электростимулятора Model 2100 (A-M Systems, США). Расстояние между стимулирующим электродом и районом регистрации спайковой активности составляло 2.5–3 мм.

Протокол регистрации активности нейронов супрахиазматического ядра во второй серии экспериментов был аналогичным первой серии, однако аппликация каждого раствора заканчивалась периодом электростимуляции аркуатного ядра. Вначале регистрировали реакцию нейрона на электростимуляцию аркуатного ядра в исходном состоянии (в условиях перфузии среза искусственной цереброспинальной жидкостью). Затем апплицировали в перфузионный раствор инсулин в концентрации 15 нМ на 10 мин, после чего вновь производили электростимуляцию аркуатного ядра на фоне действия инсулина. Наконец снова переключали перфузию на искусственную цереброспинальную жидкость для отмывания среза от инсулина в течение 15 мин и проводили заключительный тест со стимуляцией аркуатного ядра.

На основании полученных данных строили и анализировали перистимульные временные гистограммы (PSTH), по которым определяли характер и выраженность реакций нейронов на стимуляцию. Данная электрофизиологическая техника основана на представлении о том, что сверхпороговый стимул закономерно вызывает генерацию спайка в аксонах, афферентных по отношению к регистрируемой клетке, и что стимуляции подвергается локальная область, прилегающая к кончику стимулирующего электрода (менее 140 мкм от места стимуляции [28]). Гистограмма строилась путем суммации данных об индивидуальных моментах генерации спайков в пределах каждого 1-секундного интервала от предыдущего до последующего стимула за весь период стимуляции [29], составлявший, в зависимости от уровня спайковой активности клетки, от 100 до 400 с. Для определения моментов начала 1-секундных циклов при построении гистограмм в качестве триггера использовали информацию, содержащуюся в канале артефактов стимуляции.

Полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке. Для сравнения значений исследуемых показателей в ходе экспериментальных воздействий с исходным состоянием использовали парный  $t$ -тест или ранговый тест Уилкоксона (в случае несоответствия распределения данных в выборках нормальному). Нормальность распределения данных в выборках проверяли с помощью теста Шапиро–Уилка, однородность дисперсий – с помощью теста Левена. Статистические данные о параметрах спайковой активности нейронов в исходном состоянии представлены как средние арифметические  $\pm$  стандартные ошибки среднего. Изменения исследуемых параметров считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ . При обработке перистимульных временных гистограмм применялась процедура кумулятивного суммирования [30], дающая возможность идентифицировать малые различия в вероятности генерации спайков в постстимульный период относительно контрольного периода, в качестве которого использовали 200 мс, непосредственно предшествующих стимулу. Реакции возбуждения или торможения идентифицировали по статистически значимому росту или снижению суммарного количества спайков в каждом из интервалов продолжительностью 2 мс, расположенных вслед за моментом стимула, по сравнению с контролем. Статистически значимыми при анализе перистимульных временных гистограмм считали лишь те реакции, где уровень  $p$  в непарном  $t$ -тесте или ранговом тесте Манна–Уитни составлял  $p < 0.02$  [28].

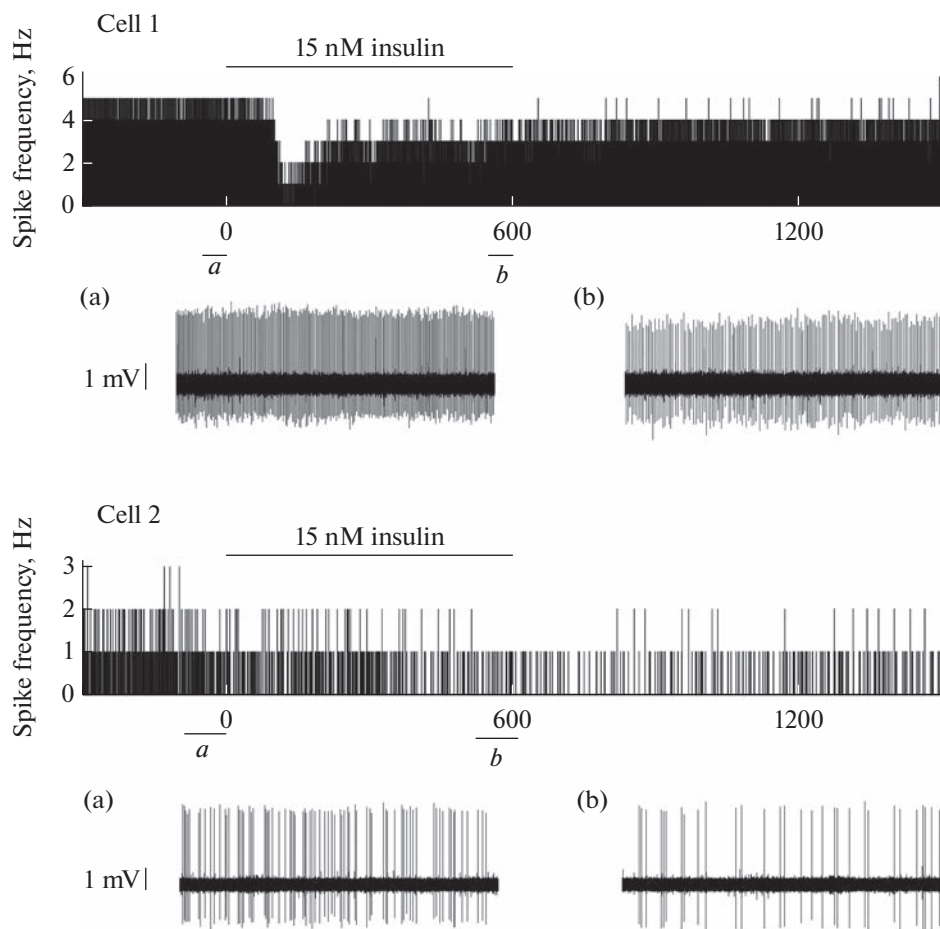
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Влияние 15 нМ инсулина на параметры спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра*

Реакции параметров спайковой активности на воздействие инсулина изучены на 75 нейронах супрахиазматического ядра. Для всей этой группы нейронов частота генерации потенциалов действия составила  $2.55 \pm 0.26 \text{ с}^{-1}$ , энтропия распределения межспайковых интервалов равнялась  $6.59 \pm 0.10$  бит, а обоюдная информация между сопряженными межспайковыми интервалами составила  $0.060 \pm 0.013$  бит.

Аппликации 15 нМ инсулина в перфузионный раствор вызвали изменение частоты генерации потенциалов действия у 34 из 75 (45.3%) протестированных нейронов супрахиазматического ядра. Остальные нейроны (41 из 75; 54.7%) не изменяли уровень спайковой активности под влиянием инсулина.

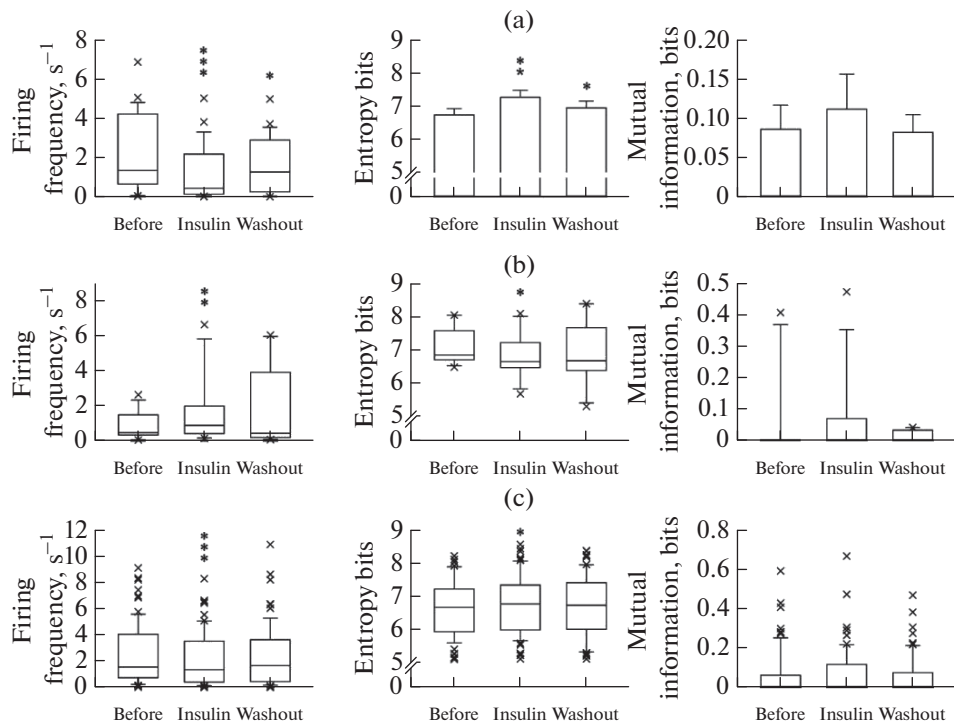
У 25 из 75 нейронов (33.3%) реакции на воздействие инсулина характеризовались снижением частоты генерации спайков. Примеры реакций на аппликацию инсулина в виде снижения уровня спайковой активности у нейронов супрахиазматического ядра показаны на рис. 1. Медиана частоты спайков у нейронов данной группы снизилась с  $1.34 \text{ с}^{-1}$  в исходном состоянии до  $0.43 \text{ с}^{-1}$  в присутствии инсулина ( $p < 0.001$ ). Характерной особенностью реакций этих клеток на аппликацию инсулина был рост энтропии распределения межспайковых интервалов с  $6.73 \pm 0.19$  до  $7.26 \pm 0.21$  бит ( $p < 0.01$ ), что свидетельствует о повышении степени нерегулярности генерации спайков. Статистически значимых изменений обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами обнаружено не было, несмотря на умеренную тенденцию к увеличению данного показателя, значение которого составило  $0.086 \pm 0.031$  бит в исходном состоянии и  $0.111 \pm 0.045$  бит при воздействии инсулина ( $p = 0.41$ ). Реакции нейронов супрахиазматического ядра противоположной направленности, в виде повышения уровня биоэлектрической активности, на воздействие 15 нМ инсулина зарегистрированы в 9 случаях из 75 (12.0%). Статистический анализ с использованием  $z$ -теста показал, что такие реакции на аппликации инсулина встречались реже, чем реакции в виде снижения активности ( $p < 0.01$ ). Рост уровня активности клеток проявлялся в повышении ме-



**Рис. 1.** Примеры реакций двух нейронов (Cell 1, Cell 2) супрахиазматического ядра на аппликацию 15 нМ инсулина. Для обоих нейронов в верхней части рисунка представлены гистограммы с данными об изменении уровня спайковой активности клеток по ходу эксперимента. Период аппликации инсулина показан горизонтальным отрезком над гистограммой. По оси абсцисс — время в секундах (момент начала аппликации соответствует 0), по оси ординат — частота генерации спайков ( $\text{с}^{-1}$ ). Горизонтальным отрезком под гистограммой (*a* и *b*) соответствуют 50-секундные интервалы записи спайковой активности для первого нейрона, и 100-секундные интервалы записи для второго нейрона, представленные под гистограммой: (*a*) — непосредственно перед воздействием, (*b*) — в конце аппликации инсулина.

дианы частоты генерации потенциалов действия с 0.47 до 0.89  $\text{с}^{-1}$  ( $p < 0.01$ ). Одновременно с повышением уровня спайковой активности у данной группы нейронов при воздействии инсулина наблюдалось небольшое, но статистически значимое снижение медианы энтропии распределения межспайковых интервалов с 6.85 до 6.65 бит ( $p < 0.05$ ). Изменений обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами обнаружено не было ( $p = 1.00$ ), а значение медианы данного показателя и в исходном состоянии, и в период действия инсулина оказалось равным нулю.

Анализ реакций на воздействие инсулина всех 75 протестированных нейронов как единой группы также выявил статистически значимые изменения показателей



**Рис. 2.** Влияние 15 нМ инсулина на частоту генерации потенциалов действия,  $\text{с}^{-1}$  (левые диаграммы), энтропию распределения межспайковых интервалов, бит (средние диаграммы) и обоюдную информацию между сопряженными межспайковыми интервалами, бит (правые диаграммы) нейронов супрахиазматического ядра. (а) — нейроны, активность которых снижалась под влиянием инсулина ( $n = 25$ ). (б) — нейроны, активность которых повышалась под влиянием инсулина ( $n = 9$ ). (с) — вся совокупность зарегистрированных нейронов ( $n = 75$ ). Обозначения под диаграммами: Before — исходное состояние; Insulin — на фоне действия инсулина; Washout — после отмывания среза искусственной цереброспинальной жидкостью. Звездочками отмечены статистически значимые различия с исходным состоянием: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

спайковой активности клеток супрахиазматического ядра. Медиана частоты генерации спайков снижалась под влиянием инсулина с  $1.56$  до  $1.37 \text{ с}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ). Одновременно с этим наблюдалось увеличение степени нерегулярности спайков, что отражалось в небольшом, но статистически значимом росте медианы энтропии распределения межспайковых интервалов с  $6.67$  до  $6.79$  бит ( $p < 0.05$ ). В то же время обоюдная информация между сопряженными межспайковыми интервалами не изменялась ( $p = 0.44$ ). Медиана этого показателя равнялась нулю и в исходном состоянии и после аппликации инсулина, что отражает отсутствие паттернирования информации в спайковом коде в данных экспериментальных условиях.

Статистические данные об изменениях показателей спайковой активности под влиянием инсулина у вышеописанных групп клеток представлены на рис. 2.

Реакции нейронов супрахиазматического ядра на воздействие инсулина характеризовались полной или частичной обратимостью. На рис. 2 отчетливо прослеживается тенденция к восстановлению исходной величины всех исследуемых параметров после отмывания среза.

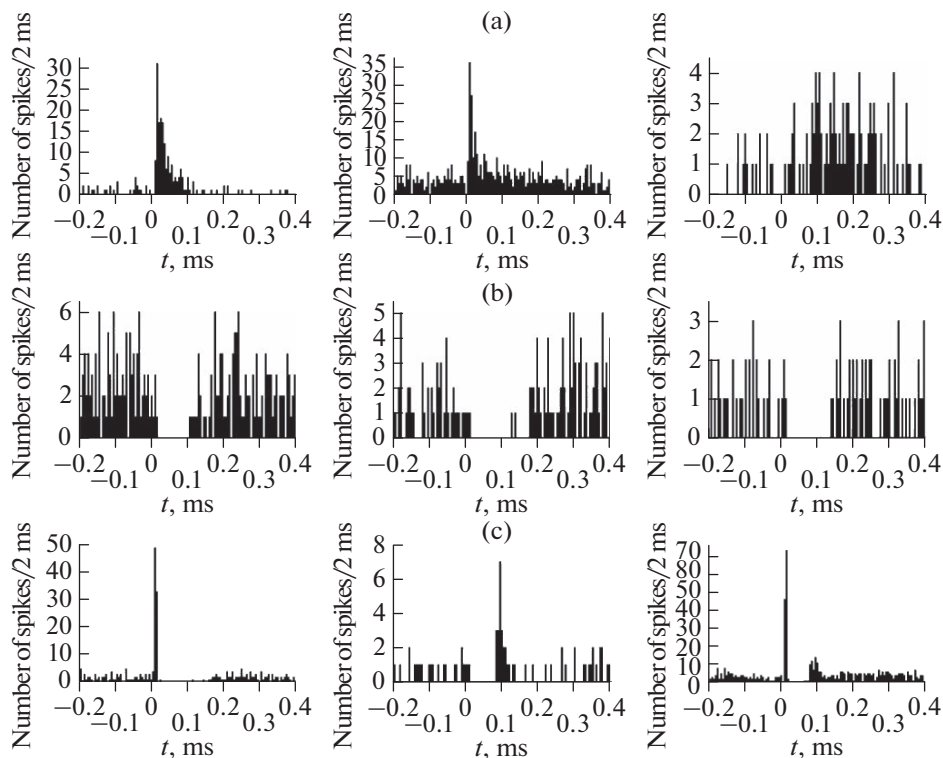
*Влияние 15 нМ инсулина на функциональное состояние синаптических входов  
к нейронам супрахиазматического ядра из аркуатного ядра*

В настоящей работе охарактеризованы реакции на стимуляцию вентромедиальной области аркуатного ядра 38 нейронов супрахиазматического ядра. Статистически значимые реакции на стимуляцию ( $p < 0.02$ ) в исходном состоянии (до аппликации инсулина) зарегистрированы у 24 протестированных клеток из (63.2%), у остальных 13 нейронов (34.2%) ответных реакций на стимуляцию не обнаружено. В числе реакций на стимуляцию наблюдались простые монофазные ответы (возбуждение или торможение) и комплексные реакции в форме разнообразных сочетаний возбуждения и торможения.

6 из 38 (15.8%) нейронов супрахиазматического ядра демонстрировали ответные реакции на стимуляцию в форме коротколатентного ( $< 20$  мс) ортодромного возбуждения. Реакции данного типа характеризовались пиком на перистимульных временных гистограммах (рис. 3а, левая и центральная гистограммы). Пик располагался на коротком расстоянии от момента стимула, после чего наблюдался постепенное снижающийся до контрольного уровня “хвост”. Местоположение пика на гистограмме соответствует моменту наибольшей вероятности генерации спайков постсинаптической клеткой супрахиазматического ядра, а продолжительность “хвоста” соответствует периоду, в течение которого сохраняется повышенная вероятность генерации спайков. В одном случае реакция на стимуляцию протекала в форме длиннолатентного возбуждения (рис. 3а, правая гистограмма). В данном случае на перистимульной временной гистограмме вместо единственного пика наблюдалась относительно продолжительная область роста активности, которая начиналась спустя значительный латентный период после стимула. Эта область соответствует по продолжительности интервалу времени, характеризующемуся повышенной вероятностью генерации потенциалов действия постсинаптической клеткой супрахиазматического ядра. В 6 случаях (15.8%) реакция супрахиазматических нейронов на стимуляцию аркуатного ядра протекала в форме коротколатентного ( $< 20$  мс) ортодромного торможения (рис. 3б). Этот тип реакции находил отражение в характерной форме перистимульной временной гистограммы с “провалом”, располагавшемся на коротком расстоянии от момента стимула, после чего происходило постепенное восстановление активности до контрольного уровня. Область “провала” соответствует периоду сниженной вероятности генерации спайков исследуемым нейроном супрахиазматического ядра.

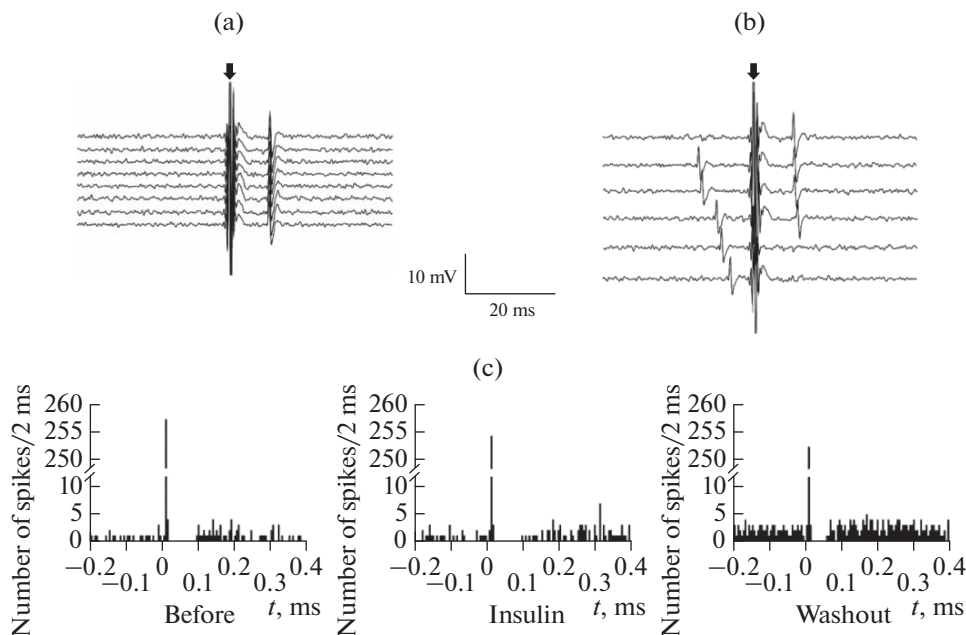
В 11 случаях (28.9%) зарегистрированы комплексные реакции на стимуляцию аркуатного ядра. Такие реакции состояли из различных сочетаний возбуждения и торможения. Наиболее часто (у 6 нейронов; 15.8%) комплекс включал коротколатентное ортодромное возбуждение и последующее ортодромное торможение. Характерный пример реакции данного типа представлен на рис. 3с (левая гистограмма). В одном случае нейрон супрахиазматического ядра ответил на стимуляцию аркуатного ядра ортодромным коротколатентным торможением с последующим ортодромным возбуждением (рис. 3с, центральная гистограмма). Один нейрон супрахиазматического ядра ответил на стимуляцию комплексной реакцией, которая состояла из двух ортодромных возбуждений — коротколатентного и длиннолатентного (рис. 3б), при этом уровень активности в интервале между двумя фазами возбуждения (28 мс) не отличался от контроля ( $p = 0.21$ ). В одном случае ответная реакция на стимуляцию аркуатного ядра протекала в три фазы: ортодромного коротколатентного и длиннолатентного возбуждения, между которыми имело место ортодромное торможение (рис. 3с).

У 2 из 38 (5.3%) исследованных нейронов супрахиазматического ядра наблюдалась комплексная реакция на стимуляцию аркуатного ядра в форме антидромного возбуждения с последующим ортодромным торможением (рис. 4). В условиях ис-



**Рис. 3.** Примеры перистимульных временных гистограмм нейронов супрахиазматического ядра при стимуляции аркуатного ядра. (а) – ортодромное возбуждение: слева и в центре – коротколатентное, справа – длиннолатентное. (б) – ортодромное коротколатентное торможение. (с) – комплексные реакции: слева – коротколатентное ортодромное возбуждение и ортодромное торможение; в центре – коротколатентное ортодромное возбуждение и ортодромное возбуждение; справа – коротколатентное ортодромное возбуждение, ортодромное торможение и длиннолатентное ортодромное возбуждение. По оси абсцисс – время, мс (отметка “0” соответствует моменту стимула); по оси ординат – суммарное количество спайков за каждый 2-миллисекундный интервал времени.

пользования стабильных параметров сверхпороговых стимулов наиболее важным признаком антидромного возбуждения является устойчивая генерация спайков с постоянным коротким латентным периодом (рис. 4а). Это находит свое отражение в характерной форме перистимульной временной гистограммы в форме узкого высокого пика, который располагается на коротком расстоянии от момента стимула (рис. 4с). Такая форма гистограммы свидетельствует о постоянстве латентного периода генерации спайков при антидромной стимуляции. Дополнительным признаком антидромного возбуждения служит явление коллизии – увеличенная продолжительность латентного периода или отсутствие антидромного спайка в тех случаях, когда момент появления спонтанного спайка приходится на период, непосредственно предшествующий стимулу (рис. 4б). При этом генерация антидромного спайка не происходит по причине того, что момент его потенциальной генерации совпадает с рефрактерной фазой, следующей за спонтанным спайком. У двух нейронов, демонстрировавших реакцию данного типа, латентный период генера-

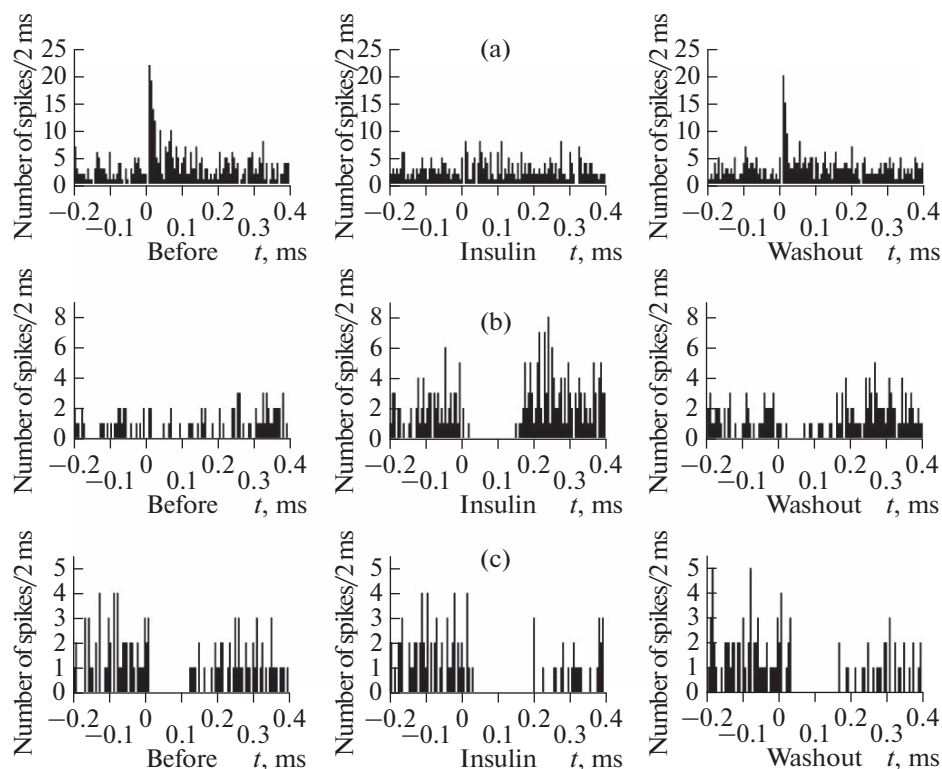


**Рис. 4.** Влияние 15 нМ инсулина на перистимульную временную гистограмму нейрона супрахиазматического ядра в виде реакции антидромного возбуждения с последующим ортодромным торможением на стимуляцию аркуатного ядра. (а) — фрагменты нейрограмм в области артефактов стимуляции (отмечены стрелкой) в исходном состоянии. Суперпозиция нейрограмм с 8 последовательными стимулами показывает постоянство латентного периода вызванного спайка. (б) — появление спонтанного спайка непосредственно перед моментом стимула приводит к удлинению латентного периода вызванного спайка или к полному исчезновению последнего (2 нижние нейрограммы) в соответствии с явлением коллизии. (с) — перистимульные временные гистограммы, суммирующие данные о реакциях на воздействие 270 последовательных стимулов в исходном состоянии (Before), на фоне действия инсулина (Insulin) и после 15-минутного отмывания среза искусственной цереброспинальной жидкостью (Washout). По оси абсцисс — время, мс (метка “0” соответствует моменту стимула); по оси ординат — суммарное количество спайков за каждый 2-миллисекундный интервал времени.

ции антидромных спайков при стимуляции аркуатного ядра составил  $10.70 \pm 0.11$  мс ( $n = 126$  спайков) и  $10.20 \pm 0.02$  мс ( $n = 257$  спайков).

Аппликации 15 нМ инсулина в ряде случаев приводили к качественным изменениям ответных реакций клеток супрахиазматического ядра на стимуляцию аркуатного ядра. Качественные изменения проявлялись в виде исчезновения исходной реакции (или ее фазы), либо в появлении новой. В отдельных наблюдениях после аппликации инсулина возникали количественные изменения, которые выражались в изменении латентного периода или продолжительности реакции, однако групповой анализ таких изменений показал, что они не достигали уровня статистической значимости.

В группе нейронов, отреагировавших коротколатентным ортодромным возбуждением на стимуляцию аркуатного ядра ( $n = 6$ ), количественных изменений реакции на стимуляцию под влиянием инсулина выявлено не было. В исходном состоянии латентный период реакции составлял  $11.7 \pm 1.4$  мс, а на фоне действия инсулина он равнялся  $13.2 \pm 2.3$  мс ( $p = 0.46$ ). Продолжительность ортодромного возбуждения, составившая в исходном состоянии  $30.0 \pm 11.1$  мс, демонстрировала



**Рис. 5.** Влияние 15 нМ инсулина на перистимульную временную гистограмму нейронов супрахиазматического ядра в виде реакций коротколатентного ортодромного возбуждения (а), отсутствия исходной реакции (б) и реакции коротколатентного ортодромного торможения (с) на стимуляцию аркуатного ядра. Представлены перистимульные временные гистограммы в исходном состоянии (Before), на фоне действия инсулина (Insulin) и после 15-минутного отмывания среза искусственной cerebrospinalной жидкостью (Washout). По оси абсцисс — время, мс (отметка “0” соответствует моменту стимула); по оси ординат — суммарное количество спайков за каждый 2-миллисекундный интервал времени.

тенденцию к увеличению до  $36.8 \pm 21.0$  мс, однако это изменение не достигло уровня статистической значимости ( $p = 0.33$ ). Вместе с тем инсулин вызвал качественные изменения реакций на стимуляцию аркуатного ядра у двух нейронов этой группы. Так, нейрон, перистимульные временные гистограммы которого показаны на рис. 5а, в исходном состоянии отвечал на стимуляцию коротколатентным ортодромным возбуждением ( $p < 0.01$ ). Однако в присутствии инсулина статистически значимого возбуждения у данного нейрона уже не наблюдалось ( $p = 0.07$ ). После 15-минутного отмывания среза искусственной cerebrospinalной жидкостью произошло восстановление реакции ( $p < 0.05$ ). На гистограмме другого нейрона, отвечавшего в исходном состоянии на стимуляцию аркуатного ядра коротколатентным ортодромным возбуждением ( $p < 0.01$ ), под действием инсулина появилась вторая, тормозная фаза реакции ( $p < 0.001$ ); это привело к трансформации простой реакции в комплексную. Отмывание данного нейрона искусственной cerebrospinalной жидкостью не вызвало полного восстановления исходного характера реакции на стимуляцию. Реакция по-прежнему сохранила черты комплексного ответа в виде коротколатентного ортодромного возбуждения ( $p < 0.001$ ) с последующим торможением ( $p < 0.001$ ).

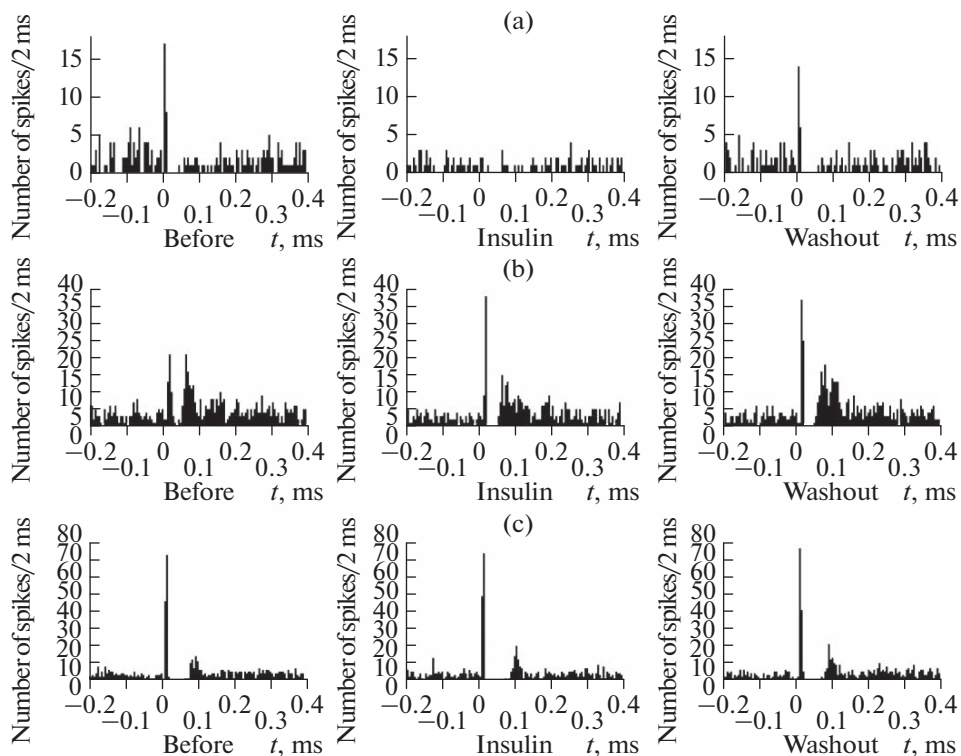
В группе из 6 нейронов, отвечавших на стимуляцию аркуатного ядра простой реакцией коротколатентного ортодромного торможения, воздействие инсулина не вызвало статистически значимых изменений параметров ортодромного торможения относительно их исходных значений. В присутствии инсулина наблюдалась лишь тенденция к увеличению латентного периода реакции, который составил  $13.7 \pm 1.0$  мс в исходном состоянии и  $17.3 \pm 0.8$  мс на фоне действия инсулина ( $p = 0.06$ ). В исходном состоянии продолжительность торможения составляла  $180.0 \pm 56.4$  мс, а при воздействии инсулина —  $189.0 \pm 55.4$  мс ( $p = 0.41$ ). Существенных качественных изменений ответной реакции клеток данной группы на стимуляцию под влиянием инсулина также не наблюдалось. Пример реакции нейрона, отвечавшего на стимуляцию аркуатного ядра коротколатентным ортодромным торможением, представлен на рис. 5с.

Наиболее часто (в 6 случаях) среди комплексных реакций нейронов супрахиазматического ядра на стимуляцию аркуатного ядра встречалось последовательное сочетание коротколатентного ортодромного возбуждения и ортодромного торможения. У двух клеток с таким типом реакции на стимуляцию воздействие инсулина привело к качественной трансформации ответа. У нейрона, перистимульные временные гистограммы которого представлены на рис. 6а, аппликация инсулина вызвала исчезновение первой фазы реакции — ортодромного возбуждения, при сохранении второй, тормозной фазы ( $p < 0.01$ ). Отмывание среза в течение 15 мин искусственной цереброспинальной жидкостью привело к полному восстановлению фазы возбуждения ( $p < 0.01$ ) и ее исходных параметров. В конце отмывания также сохранилась и последующая фаза торможения ( $p < 0.001$ ). У другого нейрона, отвечавшего на стимуляцию аркуатного ядра аналогичной комплексной реакцией, воздействие инсулина привело к исчезновению обоих ее компонентов, причем в данном случае признаков восстановления исходной реакции не наблюдалось и после 15-минутного отмывания среза искусственной цереброспинальной жидкостью. У остальных 4 нейронов с данной формой комплексной реакции на стимуляцию инсулин не вызвал статистически значимых количественных и качественных изменений параметров (латентного периода и продолжительности) каждой из двух фаз реакции ( $p > 0.05$ ).

У двух нейронов супрахиазматического ядра комплексная реакция на стимуляцию аркуатного ядра состояла из начальной фазы антидромного возбуждения ( $p = 0.01$ ) и последующей фазы ( $p < 0.001$ ) ортодромного торможения (рис. 4с). В исходном состоянии латентный период генерации антидромных спайков этими нейронами при стимуляции аркуатного ядра составлял  $10.7 \pm 0.1$  и  $10.2 \pm 0.02$  мс. В период действия инсулина латентный период генерации антидромных спайков изменился незначительно ( $p > 0.05$ ), составив соответственно  $10.5 \pm 0.1$  и  $10.1 \pm 0.06$  мс. Под действием инсулина параметры последующей фазы ортодромного торможения у данных нейронов также не претерпевали существенных изменений (рис. 4с).

У одного нейрона супрахиазматического ядра (рис. 3с, в центре) комплексная реакция на стимуляцию аркуатного ядра проявлялась в форме ортодромного коротколатентного торможения ( $p = 0.01$ ) и последующего ортодромного возбуждения ( $p < 0.001$ ). В присутствии инсулина наблюдались небольшие количественные изменения параметров реакции. Произошло укорочение на 2 мс латентного периода начальной тормозной фазы реакции и увеличение продолжительности этой фазы на 4 мс; латентный период последующей фазы комплексной реакции (ортодромного возбуждения) увеличился на 2 мс, тогда как ее продолжительность уменьшилась на 18 мс.

Один нейрон супрахиазматического ядра (рис. 6б) ответил на стимуляцию комплексной реакцией в виде сочетания двух ортодромных возбуждений — коротколатентного ( $p < 0.001$ ) и длиннolatентного ( $p < 0.001$ ). Под действием инсулина про-



**Рис. 6.** Влияние 15 нМ инсулина на перистимульную временную гистограмму нейронов супрахиазматического ядра в виде комплексных реакций на стимуляцию аркуатного ядра: коротколатентного ортодромного возбуждения с последующим торможением (а), коротколатентного и длиннолатентного ортодромного возбуждения (б) и коротколатентного ортодромного возбуждения, торможения и длиннолатентного возбуждения (с). Представлены перистимульные временные гистограммы в исходном состоянии (Before), на фоне действия инсулина (Insulin) и после 15-минутного отмывания среза искусственной цереброспинальной жидкостью (Washout). По оси абсцисс — время, мс (отметка “0” соответствует моменту стимула); по оси ординат — суммарное количество спайков за каждый 2-миллисекундный интервал времени.

изошла качественная трансформация исходно двухфазной реакции в трехфазную за счет появления дополнительной фазы торможения ( $p < 0.001$ ) в интервале между коротколатентным и длиннолатентным возбуждением. После 15-минутного отмывания среза искусственной цереброспинальной жидкостью качественного восстановления исходного характера комплексной реакции у данного нейрона не произошло, поэтому реакция по-прежнему осталась трехфазной.

Наконец, в исходном состоянии один нейрон супрахиазматического ядра (рис. 6с) ответил на стимуляцию аркуатного ядра трехфазной реакцией, включавшей коротколатентное ортодромное возбуждение ( $p < 0.001$ ), ортодромное торможение ( $p < 0.001$ ) и длиннолатентное ортодромное возбуждение ( $p < 0.001$ ). На фоне действия инсулина наблюдались небольшие количественные изменения параметров второй и третьей фаз комплексной реакции, наиболее выраженным среди которых оказалось удлинение фазы ортодромного торможения на 14 мс.

У 14 (34.2%) протестированных нейронов супрахиазматического ядра статистически значимых ответных реакций на стимуляцию аркуатного ядра в исходном состоянии обнаружено не было ( $p > 0.05$ ). У 13 из 14 нейронов этой группы признаков

ответной реакции не обнаружено и в присутствии инсулина. Лишь у одного нейрона (рис. 5b), не демонстрировавшего реакции в исходном состоянии ( $p = 0.10$ ), под влиянием инсулина отчетливо проявилось ортодромное торможение ( $p < 0.001$ ), признаки которого сохранились и после 15-минутного отмывания среза искусственной цереброспинальной жидкостью ( $p < 0.001$ ) несмотря на значительное уменьшение продолжительности реакции (на 74 мс).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В циркадианной системе млекопитающих для точной синхронизации ритма циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра с 24-часовым ритмом окружающего мира используется целый ряд времязадателей. Наряду с основным, фотическим механизмом настройки [3], существуют и другие, нефотические механизмы синхронизации биологических часов. В рамках этих механизмов важную роль играют времязадатели, связанные с пищей: суточный режим приема пищи, ее состав и калорийность, метаболические сигналы и гормональные регуляторы, являющиеся носителями информации об уровне питательных веществ и метаболическом статусе [4–6], хотя физиологический механизм пищевой синхронизации циркадианной системы изучен недостаточно [31]. Гипотеза о независимом от супрахиазматического ядра осцилляторе, настраиваемом пищей (“food entrainable oscillator”, FEO, [5]), не нашла достаточных экспериментальных подтверждений, поскольку локализация такого осциллятора не установлена, и само существование его остается недоказанным.

В качестве одного из потенциальных времязадателей, связанных с пищей, рассматривается гормон инсулин. Ранее в нашем исследовании на крысах [32] было продемонстрировано, что интраназальное введение инсулина в специфическое время суток вызывает фазовое опережение циркадианного ритма произвольной локомоторной активности (бег в колесе). Недавно было установлено [33], что влияние инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) на фазу циркадианых часов проявляется как *in vivo*, так и *in vitro*, и может быть связано со стимуляцией синтеза протеина PER, вызванной активацией  $\text{PIP}_3$  и mTORC1 каскадов и подавлением микроРНК.

В настоящем электрофизиологическом исследовании изучались прямые и опосредованные механизмы влияния инсулина на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра крыс *in vitro*. В первой части настоящей работы изучено влияние инсулина на уровень спайковой активности и параметры спайкового кодирования информации нейронами супрахиазматического ядра *in vitro*. Использованный в настоящей работе подход к анализу спайковой активности, в соответствии с которым кроме частоты генерации потенциалов действия учитывались показатели спайкового кодирования информации (энтропия распределения межспайковых интервалов и обоюдная информация между сопряженными межспайковыми интервалами), позволил выполнить количественную оценку реакций нейронного кода на воздействие инсулина. Аппликация инсулина оказывала влияние на частоту генерации спайков у 45.3% нейронов супрахиазматического ядра, в остальных случаях существенных изменений активности клеток выявлено не было. Эти данные, по всей видимости, отражают значительную в количественном отношении долю нейронов супрахиазматического ядра, осуществляющих экспрессию рецепторов, способных взаимодействовать с инсулином. Такими рецепторами в этом ядре являются специфические рецепторы инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) [11, 12]. Преобладающим характером реакций, зарегистрированных в 33.3% случаев, оказалось снижение частоты генерации потенциалов действия. Лишь в 12.0% наблюдений происходил рост исходной частоты генерации потенциалов действия под

влиянием инсулина. Этот результат согласуется с данными других авторов [7] о преимущественно угнетающем влиянии инсулина на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра, а также с данными об ингибирующем влиянии инсулина на активность нейронов других структур ЦНС, в частности, нейронов аркуатного ядра, продуцирующих агути-связанный пептид и нейропептид Y (AgRP/NPY) [21], и большинства нейронов этого ядра, продуцирующих проопиомеланокортин (ПОМК) [14], нейронов префронтальной коры [22] и гиппокампа [23]. Реже встречаются свидетельства противоположного, возбуждающего влияния инсулина, возникшего, в частности, при его воздействии на 11% проопиомеланокортиновых нейронов аркуатного ядра [14], нейроны инсулярной коры [24], дофаминергические нейроны вентральной области покрышки и черной субстанции [25]. В целом обнаруженные в настоящей работе различия в реакциях спайковой активности отдельных клеток могут, в частности, объясняться активацией различных типов мембранных рецепторов нейронов супрахиазматического ядра, включением в реакцию различных каскадов внутриклеточных посредников и нейрохимическим разнообразием клеток супрахиазматического ядра. Данное ядро отличается широким набором фенотипов нейронов, продуцирующих нейропептиды (вазопрессин, вазоактивный интестинальный пептид, калретинин, гастрин-рилизинг пептид и др.) и ГАМК [34].

Поскольку основой информации, передаваемой между нейронами ЦНС, является спайковый код [35], в рамках настоящей работы для оценки эффектов инсулина на уровне супрахиазматического ядра впервые использованы параметры кодирования информации, позволяющие более полно охарактеризовать реакции спайковой активности клеток. При этом одновременно со снижением уровня активности нейронов супрахиазматического ядра под влиянием инсулина происходил рост энтропии распределения межспайковых интервалов, тогда как изменений обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами обнаружено не было. Такой характер реакции свидетельствует о том, что под действием инсулина у данной популяции клеток возникал рост нерегулярности генерации потенциалов действия без существенного изменения степени паттернирования спайковой информации в нейронном коде. В то же время у меньшей по численности группы нейронов, уровень активности которых повышался под влиянием инсулина, наблюдалось снижение энтропии распределения межспайковых интервалов, указывающее на уменьшение степени нерегулярности генерации спайков. Таким образом, воздействие инсулина на уровень активности нейронов супрахиазматического ядра, независимо от направленности реакции, сопровождалось изменениями параметра спайкового кода, отражающего нерегулярность генерации потенциалов действия. Эти результаты могут указывать на фундаментальные различия между характеристиками популяций нейронов, демонстрировавших в условиях воздействия инсулина изменения спайковой активности противоположной направленности. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что инсулин при непосредственном воздействии способен модулировать уровень активности и оказывать влияние на спайковый код относительно многочисленной популяции нейронов циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра.

Во второй части настоящей работы *in vitro* с помощью электрофизиологической техники анализа перистимульной временной гистограммы изучено влияние инсулина на функциональное состояние афферентных входов к нейронам супрахиазматического ядра из аркуатного ядра. Известно, что аркуатное ядро, играющее важную роль в регуляции аппетита и метаболизма [13], опосредует значительную часть центральных эффектов инсулина через инсулиновые и IGF-1 рецепторы [14, 15]. Ранее в электрофизиологических и нейрохимических исследованиях, а также в работах, выполненных с использованием ретроградных трейсеров, было продемонстрировано существование реципрокных связей между нейронами аркуатного и супрахиазмати-

ческого ядер [16–19, 36]. Имеются свидетельства того, что реципрокное взаимодействие между этими ядрами является необходимым условием экспрессии циркадианных ритмов [37, 38].

В настоящем исследовании более половины протестированных нейронов супрахиазматического ядра (63.2%) отвечали на стимуляцию аркуатного ядра простыми однофазными или комплексными реакциями. При этом в большинстве случаев реакции оказались коротколатентными (<20 мс). Эти результаты свидетельствуют о том, что большинство нейронов супрахиазматического ядра получают моно- и олигосинаптические проекции из подвергнувшегося стимуляции вентромедиального отдела аркуатного ядра. Следует заметить, что в интактном мозге количество таких проекций может быть даже более значительным, поскольку в электрофизиологическом исследовании *in vivo* [16] простые или комплексные реакции на стимуляцию аркуатного ядра были обнаружены у 48 из 56 нейронов супрахиазматического ядра (85.7%). В настоящей работе (так же, как и в исследовании *in vivo* [16]) коротколатентные реакции встречались гораздо чаще длиннолатентных, при этом количество коротколатентных реакций ортодромного возбуждения и торможения оказалось одинаковым. Это указывает на баланс между стимулирующим и ингибирующим влиянием на активность клеток супрахиазматического ядра со стороны аркуатного ядра. Данный каудальный вход может принимать участие в механизмах нефотической настройки циркадианного осциллятора в соответствии с уровнем энергообмена, режимом питания, выраженностью пищевой мотивации. Ранее была неоднократно продемонстрирована настройка циркадианного ритма экспрессии генов в супрахиазматическом ядре, поведенческих и физиологических циркадианных ритмов в соответствии с режимом питания, особенно в условиях сниженной калорийности пищи [39–41].

В 28.9% случаев стимуляция аркуатного ядра вызвала комплексные реакции нейронов супрахиазматического ядра, состоящие из нескольких фаз. Эти данные показывают, что значительная доля клеток супрахиазматического ядра получает два или более афферентных входа из области аркуатного ядра. Поскольку подавляющее большинство ответов характеризовалось коротким латентным периодом, данные афферентные проекции скорее всего являлись моно- или олигосинаптическими. Лишь в отдельных случаях в состав комплексных реакций входила фаза длиннолатентного возбуждения, свидетельствующая о том, что небольшая часть нейронов супрахиазматического ядра может дополнительно получать возбуждающую афферентацию из области аркуатного ядра через окольные полисинаптические проекции.

Ранее было показано, что нейронные связи между аркуатным и супрахиазматическим ядрами являются реципрокными [16–19, 36]. Существование эфферентных проекций нейронов супрахиазматического ядра в аркуатное ядро нашло подтверждение в двух экспериментах, в которых были зарегистрированы реакции антидромного возбуждения при стимуляции аркуатного ядра (рис. 4). Параметры этих реакций дают возможность ориентировочно судить о скорости аксонного проведения возбуждения между супрахиазматическим и аркуатным ядрами. Учитывая, что кратчайшее расстояние (по прямой) между стимулирующим и регистрирующим электродами составляло 2.5–3 мм, а латентный период антидромного возбуждения приблизительно равнялся 10.5 мс, расчетная скорость проведения возбуждения по аксонам в данных условиях должна была составить не менее 25–30 см/с. Принимая во внимание тот факт, что регистрация производилась при температуре на 7–10°C ниже физиологической, и учитывая данные об уменьшении скорости проведения приблизительно на 5% при снижении температуры на каждый градус в диапазоне температур 29–38°C [42], реальная скорость проведения нервных импульсов в данной области гипоталамуса *in vivo* может быть примерно на 35–50% выше. Такая

скорость проведения характерна для немиелинизированных или тонких миелинизированных аксонов ЦНС млекопитающих [43].

В основе разнообразия ответных реакций нейронов супрахиазматического ядра на стимуляцию может лежать широкий набор нейрохимических фенотипов нейронов аркуатного ядра, служивших источником афферентных входов к исследованным нейронам. В частности, в составе проекций из вентромедиального отдела аркуатного ядра в супрахиазматическое ядро следуют аксоны нейронов, продуцирующих нейропептид Y, агути-связанный пептид (AgRP), проопиомеланокортин, ГАМК, кассипептин, соматолиберин (GHRH) и соматостатин [17, 19, 44].

Одной из задач настоящего исследования было изучение модулирующего влияния инсулина на функциональное состояние афферентных входов к нейронам супрахиазматического ядра из аркуатного ядра. Статистически значимых количественных изменений латентного периода и продолжительности возбуждающих или тормозных реакций нейронов супрахиазматического ядра на электростимуляцию аркуатного ядра в присутствии инсулина зарегистрировано не было. Вместе с тем в 6 случаях (16% протестированных нейронов супрахиазматического ядра) под влиянием инсулина произошла качественная трансформация реакции, заключающаяся в исчезновении предсуществующей реакции или фазы комплексной реакции (3 нейрона) или в появлении дополнительной реакции или ее фазы (3 нейрона). Таким образом, полученные результаты являются экспериментальным подтверждением модулирующего влияния инсулина на функциональное состояние части афферентных входов, поступающих к нейронам супрахиазматического ядра из вентромедиальной области аркуатного ядра. В связи с этим особый интерес приобретают вопросы о месте приложения и механизмах модулирующего влияния инсулина. В данных экспериментальных условиях потенциально возможными представляются модуляция активности нейронов аркуатного ядра в области стимуляции, модуляция проведения потенциалов действия по аксонам, следующим из области стимуляции в супрахиазматическое ядро, либо модулирующее влияние на функциональное состояние синапсов, через которые к клеткам супрахиазматического ядра передается информация с окончаний афферентных волокон нейронов аркуатного ядра. Среди трех перечисленных возможностей наименее вероятным представляется влияние инсулина на механизмы проведения потенциалов действия по аксонам нейронов аркуатного ядра, во всяком случае в литературе отсутствуют данные о непосредственном влиянии инсулина на механизмы проведения спайков по аксонам в гипоталамусе. На отсутствие такого влияния инсулина косвенно указывают и данные двух экспериментов, выполненных в рамках настоящей работы, в которых было зарегистрировано антидромное возбуждение нейронов супрахиазматического ядра. В этих экспериментах инсулин не оказал существенного влияния на латентный период антидромного возбуждения, что свидетельствует об отсутствии изменений параметров аксонного проведения потенциалов действия в присутствии инсулина. Более вероятной выглядит возможность модулирующего влияния инсулина на уровне инсулиновых и IGF-1 рецепторов нейронов аркуатного ядра или постсинаптических структур супрахиазматического ядра. Ранее была продемонстрирована экспрессия инсулиновых и IGF-1 рецепторов в нейронах аркуатного ядра [14, 15]; через посредство этих рецепторов инсулин передает информацию о текущей потребности в пище и метаболическом статусе организма. Связывание инсулина с инсулиновыми и IGF-1 рецепторами, обладающими тирозинкиназной активностью, вызывает активацию двух основных сигнальных путей: PI3K/AKT и MAPK/ERK [45]. Нейроны супрахиазматического ядра также отличаются высоким уровнем экспрессии рецепторов инсулина и IGF-1, через посредство которых активируются PI3K/AKT и MAPK/ERK сигнальные пути [11, 12]. Тирозинкиназа  $\beta$ -субъединицы инсулиновых рецепторов нейронов супрахиазматиче-

ского ядра может одновременно активироваться мелатонином (через  $MT_1/MT_2$  рецепторы); это указывает на возможность взаимодействия мелатонина и инсулина на уровне данного ядра [11]. Результаты активации PI3K/AKT и MAPK/ERK сигнальных путей более подробно изучены на примере нейронов аркуатного ядра, где инсулин модулирует активность анорексигенных проопиомеланокортиновых (ПОМК) нейронов и орексигенных нейронов аркуатного ядра, продуцирующих агути-связанный пептид и нейропептид Y (AgRP/NPY) [21, 46–48]. На уровне ПОМК нейронов аркуатного ядра инсулин может оказывать как ингибирующее гиперполяризующее влияние за счет активации АТФ-зависимых  $K^+$  каналов [49, 50], так и возбуждающее деполяризующее влияние, опосредуемое активацией TRPC5 каналов [51]. Известно также, что инсулин способен активировать  $PI3$ -киназу (но не MAP-киназу) AgRP/NPY нейронов аркуатного ядра, что приводит к росту амплитуды  $Ca^{2+}$ -активируемого калиевого тока высокой проводимости (ВК-ток), и, в свою очередь, вызывает рост биоэлектрической активности данных клеток [52]. Транскриптомные исследования аркуатного ядра выявили гетерогенность расположенных здесь нейронов и позволили идентифицировать субпопуляции ПОМК и AgRP клеток, демонстрирующие существенные различия в транскрипции при изменениях энергетического статуса организма [53–55]. Такая неоднородность, наряду с нейрохимическими и функциональными различиями между ПОМК и AgRP клетками, могла вносить свой вклад в обнаруженное в настоящей работе разнообразие реакций нейронов супрахиазматического ядра на стимуляцию аркуатного ядра.

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что эффекты инсулина не сводятся к непосредственному влиянию на уровень активности и параметры спайкового кодирования информации нейронами супрахиазматического ядра. Дополнительным механизмом влияния этого гормона на функциональное состояние циркадианного осциллятора является модуляция параметров афферентных входов из области аркуатного ядра, благодаря чему инсулин может вовлекаться в синхронизацию циркадианных биологических часов в соответствии с выраженностью пищевой мотивации и уровнем метаболизма.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комитета по биоэтике биологического факультета Самарского национального исследовательского университета им. академика С.П. Королева (протокол № 11 от 3.10.2013).

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке средств финансирования Программы развития Самарского национального исследовательского университета им. академика С.П. Королева на 2021–2030 годы в рамках программы “Приоритет-2030”. Автор А.А.И. поддержан грантом Президента РФ для молодых российских ученых-кандидатов наук МК-4515.2022.2.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов (А.Н.И., К.А.М., И.Д.Р.), подготовка экспериментальных животных, оборудования и растворов (О.В.Л., Т.С.И.), сбор данных (А.Н.И., К.А.М., О.В.Л., И.Д.Р.), обработка данных (А.Н.И., К.А.М., А.А.И., О.В.Л.), написание и редактирование манускрипта (А.Н.И., И.Д.Р., А.А.И.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арушанян ЭБ, Попов АВ (2011) Современные представления о роли супрахиазматических ядер гипоталамуса в организации суточного периодизма физиологических функций. Успехи физиол наук 42(4): 39–58. [Arushanian EB, Popov AV (2011) Recent data about the role of hypothalamic suprachiasmatic nucleus in circadian organization of physiological functions. Uspekhi Fiziol Nauk 42(4): 39–58. (In Russ)].
2. Hastings MH, Brancaccio M, Maywood ES (2014) Circadian pacemaking in cells and circuits of the suprachiasmatic nucleus. J Neuroendocrinol 26: 2–10. <https://doi.org/10.1111/jne.12125>
3. Ashton A, Foster RG, Jagannath A (2022) Photic entrainment of the circadian system. Int J Mol Sci 23: 729. <https://doi.org/10.3390/ijms23020729>
4. Kohsaka A, Bass J (2001) A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. Trends Endocrinol Metab 18: 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.11.005>
5. Mistlberger R (2009) Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. Eur J Neurosci 30: 1718–1729. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06965.x>
6. Challet E, Mendoza J (2010) Metabolic and reward feeding synchronises the rhythmic brain. Cell Tissue Res 341: 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1001-9>
7. Shibata S, Liou SY, Ueki S, Oomura Y (1986) Inhibitory action of insulin on suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slice preparations. Physiol Behav 36: 79–81. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(86\)90077-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90077-6)
8. Bhumbra GS, Inyushkin AN, Saeb-Parsy K, Hon A, Dyball RED (2005) Rhythmic changes in spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus. J Physiol 553: 291–307. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.079848>
9. Inyushkin AN, Bhumbra GS, Dyball RED (2009) Leptin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus. J Neuroendocrinol 21: 705–714. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01889.x>
10. Инюшкин АН, Петрова АА, Ткачева МА, Инюшкина ЕМ (2015) Влияние нейропептида Y на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра крыс *in vitro*. Рос физиол журн им ИМ Сеченова 101: 1257–1269. [Inyushkin AN, Petrova AA, Tkacheva MA, Inyushkina EM (2015) The effect of neuropeptide Y on spike activity of neurons in the suprachiasmatic nucleus of rat *in vitro*. Russ J Physiol 101: 1257–1269. (In Russ)].
11. Anhe GF, Caperuto LC, Pereira-Da-Silva M, Souza LC, Hirata AE, Velloso LA, Cipolla-Neto J, Carvalho CRO (2004) *In vivo* activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. J Neurochem 90: 559–566. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02514.x>
12. Bondy CA, Cheng CM (2004) Signaling by insulin-like-growth-factor-1 in brain. Eur J Pharmacol 490: 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.042>
13. Jais A, Bruning JC (2022) Arcuate nucleus-dependent regulation of metabolism — pathways to obesity and diabetes mellitus. Endocr Rev 43: 314–328. <https://doi.org/10.1210/edrev/bnab025>
14. Dodd GT, Michael NJ, Lee-Young RS, Mangiafico SP, Pryor JT, Munder AC, Simonds SE, Bruning JC, Zhang ZY, Cowley MA, Andrikopoulos S, Horvath TL, Spanswick D, Tiganis T (2018) Insulin regulates POMC neuronal plasticity to control glucose metabolism. eLife 7: e38704. <https://doi.org/10.7554/eLife.38704>
15. Balland E, Chen W, Dodd GT, Conductier G, Coppari R, Tiganis T, Cowley MA (2019) Leptin signaling in the arcuate nucleus reduces insulin's capacity to suppress hepatic glucose production in obese mice. Cell Rep 26: 346–355. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.061>
16. Saeb-Parsy K, Lombardelli S, Khan ZF, McDowall K, Au-Yong ITH, Dyball REJ (2000) Neural connections of hypothalamic neuroendocrine nuclei in the rat. J Neuroendocrinol 12: 635–648. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00503.x>
17. Yi CX, van der Vliet J, Dai J, Yin G, Ru L, Buijs RM (2006) Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. Endocrinology 147: 283–294. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1051>

18. *Guzman-Ruiz M, Sadari N, Cazarez-Marquez F, Guerrero-Vargas NN, Basualdo MC, Acosta-Galvan G, Buijs RM* (2014) The suprachiasmatic nucleus changes the daily activity of the arcuate nucleus  $\alpha$ -MSH neurons in male rats. *Endocrinology* 155: 525–535.  
<https://doi.org/10.1210/en.2013-1604>
19. *Padilla SL, Perez JG, Ben-Hamo M, Johnson CW, Sanchez REA, Bussi IL, Palmiter RD, de la Iglesia HO* (2019) Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus orchestrate circadian rhythms and metabolism. *Curr Biol* 29: 592–604.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.01.022>
20. *Scherer T, Sakamoto K, Buettner C* (2021) Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nat Rev Endocrinol* 17: 468–483.  
<https://doi.org/10.1038/s41574-021-00498-x>
21. *Konner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, Xu C, Enriori P, Hampel B, Barsh GS, Kahn CR, Cowley MA, Ashcroft FM, Bruning JC* (2007) Insulin action in AgRP- expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab* 5: 438–449.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.004>
22. *Trujeque-Ramos S, Castillo-Rolon D, Galarraga E, Tapia D, Arenas-Lopez G, Mihailescu S, Hernandez-Lopez S* (2018) Insulin regulates GABA<sub>A</sub> receptor-mediated tonic currents in the prefrontal cortex. *Front Neurosci* 12: 345.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00345>
23. *Hammoud H, Netsyk O, Tafreshiha AS, Korol SV, Jin Z, Li PJ, Birnir B* (2021) Insulin differentially modulates GABA signalling in hippocampal neurons and, in an age-dependent manner, normalizes GABA-activated currents in the tg-APP<sup>Swe</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Physiol* 232: e13623.  
<https://doi.org/10.1111/apha.13623>
24. *Takei H, Fujita S, Shirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M* (2010) Insulin facilitates repetitive firing in rat insular cortex via phosphoinositide 3-kinase but not mitogen activated protein kinase cascade. *Neuroscience* 170: 1199–1208.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.07.061>
25. *Konner AC, Hess S, Tovar S, Mesaros A, Sanchez-Lasheras C, Evers N, Verhagen LAW, Bronneke HS, Kleinridders A, Hampel B, Kloppenburg P, Bruning JC* (2011) Role for insulin signaling in catecholaminergic neurons in control of energy homeostasis. *Cell Metab* 13: 720–728.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.021>
26. *Bhumra GS, Inyushkin AN, Dyball RED* (2004) Assessment of spike activity in the supraoptic nucleus. *J Neuroendocrinol* 16: 390–397.  
<https://doi.org/10.1111/j.0953-8194.2004.01166.x>
27. *Brown TM, Coogan AN, Cutler DJ, Hughes AT, Piggins HD* (2008) Electrophysiological actions of orexins on rat suprachiasmatic neurons in vitro. *Neurosci Lett* 448: 273–278.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.10.058>
28. *Cui LN, Saeb-Parsy K, Dyball REJ* (1997) Neurones in the supraoptic nucleus of the rat are regulated by a projection from the suprachiasmatic nucleus. *J Physiol* 502: 149–159.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.149bl.x>
29. *Gerstein GL, Kiang NYS* (1960) An approach to the quantitative analysis of electrophysiological data from single neurons. *Biophys J* 1: 15–28.  
[https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(60\)86872-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(60)86872-5)
30. *Ellaway PH* (1978) Cumulative sum technique and its application to the analysis of peristimulus time histograms. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 45: 302–304.  
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(78\)90017-2](https://doi.org/10.1016/0013-4694(78)90017-2)
31. *Pendergast JS, Yamazaki S* (2018) The mysterious food-entrainable oscillator: insights from mutant and engineered mouse models. *J Biol Rhythms* 33: 458–474.  
<https://doi.org/10.1177/0748730418789043>
32. *Инюшкин АН, Мистрюгов КА, Громова ДС, Пугачев ЕИ, Беляков ВИ, Инюшкина ЕМ* (2011) Влияние инсулина на циркадианный ритм произвольной локомоторной активности крыс. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 97: 678–689. [*Inyushkin AN, Mistrugov KA, Gromova DS, Pugachev EI, Belyakov VI, Inyushkina EM* (2011) The effect of insulin on circadian rhythm of voluntary locomotor activity in rats. *Russ J Physiol* 97: 678–689. (In Russ)].
33. *Crosby P, Hamnett R, Putker M, Hoyle NP, Reed M, Karam CJ, Maywood ES, Stangherlin A, Chesham JE, Hayter EA, Rosenbrier-Ribeiro L, Newham P, Clevers H, Bechtold DA, O'Neil JS* (2019) Insulin/IGF-1 drives PERIOD synthesis to entrain circadian rhythms with feeding time. *Cell* 177: 896–909.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.017>
34. *Moore RY, Speh JC, Leak RK* (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309: 89–98.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-002-0575-2>
35. *Campo AT* (2020) Inferring neural information flow from spiking data. *Comput Struct Biotechnol J* 18: 2699–2708.  
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.007>

36. Krout KE, Kawano J, Mettenleiter TC, Loewy AD (2002) CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience* 110: 73–92.  
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00551-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00551-6)
37. Buijs FN, Guzman-Ruiz M, Leon-Mercado L, Basualdo MC, Escobar C, Kalsbeek A, Buijs RM (2017) Suprachiasmatic nucleus interaction with the arcuate nucleus; essential for organizing physiological rhythms. *eNeuro* 4: e0028-17.2017.  
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0028-17.2017>
38. Mendez-Hernandez R, Escobar C, Buijs RM (2020) Suprachiasmatic nucleus–arcuate nucleus axis: interaction between time and metabolism essential for health. *Obesity* (2020) 28: S10–S17.  
<https://doi.org/10.1002/oby.22774>
39. Bellet MM, Sassone-Corsi P (2010) Mammalian circadian clock and metabolism – the epigenetic link. *J Cell Sci* 123: 3837–3848.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.051649>
40. Challet E (2010) Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *J Comp Physiol B* 180: 631–644.  
<https://doi.org/10.1007/s00360-010-0451-4>
41. Mistlberger RE (2011) Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol Behav* 104: 535–545.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06965.x>
42. Lowitzsch K, Hopf HC, Galland J (1977) Changes of sensory conduction velocity and refractory periods with decreasing tissue temperature in man. *J Neurol* 216: 181–188.  
<https://doi.org/10.1007/BF00313619>
43. Debanne D, Campanac E, Bialowas A, Carlier E, Alcaraz G (2011) Axon physiology. *Physiol Rev* 91: 555–602.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2009>
44. Feifel D, Vaccarino FJ (1994) Growth hormone-regulatory peptides (GHRH and somatostatin) and feeding: a model for the integration of central and peripheral function. *Neurosci Biobehav Rev* 18: 421–443.
45. Kleinridders A (2016) Deciphering brain insulin receptor and insulin-like growth factor 1 receptor signalling. *J Neuroendocrinol* 28:  
<https://doi.org/10.1111/jne.12433>
46. Varela L, Horvath TL (2012) Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep* 13: 1079–1086.  
<https://doi.org/10.1038/embor.2012.174>
47. Vogt MC, Bruning JC (2013) CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism - from embryo to old age. *Trends Endocrinol Metab* 24: 76–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.004>
48. Zhang ZY, Dodd GT, Tiganis T (2015) Protein tyrosine phosphatases in hypothalamic insulin and leptin signaling. *Trends Pharmacol Sci* 36: 661–674.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.07.003>
49. Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML (2000) Insulin activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* 3: 757–758.  
<https://doi.org/10.1038/77660>
50. Williams KW, Margatho LO, Lee CE, Choi M, Lee S, Scott MM, Elias CF, Elmquist JK (2010) Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci* 30: 2472–2479.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3118-09.2010>
51. Qiu J, Wagner EJ, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (2018) Insulin and leptin excite anorexigenic proopiomelanocortin neurones via activation of TRPC5 channels. *J Neuroendocrinol* 30: e12501.  
<https://doi.org/10.1111/jne.12501>
52. Yang MJ, Wang F, Wang JH, Wu WN, Hu ZL, Cheng J, Yu DF, Long LH, Fu H, Xie N, Chen JG (2010) PI3K integrates the effects of insulin and leptin on large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Am J Physiol* 298: E193–E201.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00155.2009>
53. Henry FE, Sugino K, Tozer A, Branco T, Sternson SM (2015) Cell type-specific transcriptomics of hypothalamic energy-sensing neuron responses to weight-loss. *eLife* 4: e09800.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.09800>
54. Campbell JN, Macosko EZ, Fenselau H, Pers TH, Lyubetskaya A, Tenen D, Goldman M, Versteegen AM, Resch JM, McCarroll SA, Rosen ED, Lowell BB, Tsai LT (2017) A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat Neurosci* 20: 484–496.  
<https://doi.org/10.1038/nn.4495>
55. Chen R, Wu X, Jiang L, Zhang Y (2017) Single-Cell RNA-Seq reveals hypothalamic cell diversity. *Cell Rep* 18: 3227–3241.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.004>

**The Effects of Insulin on Spike Activity of the Suprachiasmatic Nucleus Neurones and Functional State of Afferent Inputs from the Arcuate Nucleus in Rats**

**A. N. Inyushkin<sup>a, \*</sup>, K. A. Mistryugov<sup>b</sup>, O. V. Ledyayeva<sup>a</sup>, I. D. Romanova<sup>a</sup>,  
T. S. Isakova<sup>a</sup>, and A. A. Inyushkin<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Samara National Research University, Samara, Russia

<sup>b</sup> Samara State Medical University, Samara, Russia

\*e-mail: ainyushkin@mail.ru

In experiments on the sagittal hypothalamic slices of male Wistar rats, the effects of 15 nM insulin on the level of spike activity, parameters of spike information coding by the suprachiasmatic nucleus neurones, and functional state of afferent inputs to the neurones from the arcuate nucleus were studied. Application of insulin induced a decrease in the frequency of action potential generation and an increase in the entropy of interspike interval distribution in 33.3% of neurones recorded; in 12% of cells, the responses of opposite direction were found; in the remaining 54.7% neurones, spike activity did not change. The responses of the entropy of interspike interval distribution suggest the related changes in a degree of interspike interval irregularity induced by insulin. To characterise afferent inputs to the suprachiasmatic nucleus neurones from the arcuate nucleus, electrophysiological technique of the construction and analysis of the peristimulus time histogram (PSTH) was used. Statistically significant responses to the stimulation of the arcuate nucleus were recorded in 24 of 38 neurones of the suprachiasmatic nucleus. In 6 of the neurones, the responses were in the form of a short-latency (<20 ms) excitation, in 1 neurone in the form of a long-latency excitation, in 6 neurones in the form of a short-latency inhibition; in 11 neurones complex two- or three-phase responses in the form of different compositions of excitation and inhibition were observed. Application of 15 nM insulin induced a qualitative transformation of the responses (disappearing of the initial responses or emergence of new responses) in 5 neurones initially responded to stimulation, and in 1 neurone initially not responded to stimulation of the arcuate nucleus. Statistically significant changes in the latency or duration of the responses in the presence of insulin were not found. The results of the study suggest the ability of insulin to influence the activity level and the spike code of a respectively numerous population of neurones in the suprachiasmatic nucleus circadian oscillator as well as modulate the functional state of afferent inputs to the circadian oscillator from hypothalamic arcuate nucleus playing an important role in the control of appetite and metabolism.

**Keywords:** hypothalamus, circadian oscillator, suprachiasmatic nucleus, arcuate nucleus, insulin, spike activity, peristimulus time histogram

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЦВЕТОВОГО КОДИРОВАНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА  
ЭФФЕКТОВ ГАЛОПЕРИДОЛА НА ПОВЕДЕНИЕ ЖИВОТНЫХ  
В ТЕСТЕ “ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ”**

© 2023 г. М. С. Макаров<sup>1</sup>, Ю. И. Сысоев<sup>2, 3, 4, 5, \*</sup>, М. К. Гузенко<sup>1</sup>,  
В. А. Приходько<sup>2, 5</sup>, Э. Коркотян<sup>1, 6, \*\*</sup>, С. В. Оковитый<sup>2, 5</sup>

<sup>1</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет,  
Пермь, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup>Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>6</sup>Институт им. Вейцмана, Реховот, Израиль

\*E-mail: susoyev92@mail.ru

\*\*E-mail: eduard.korkotian@weizmann.ac.il

Поступила в редакцию 17.09.2022 г.

После доработки 18.12.2022 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

Разработка новых подходов к анализу данных поведенческих тестов имеет важное значение как для фундаментальных исследований, так и для оценки эффектов фармакологических агентов в экспериментальной нейрофармакологии. Одной из фармакологических групп, представляющей большой интерес для изучения, являются антипсихотические средства, применяемые для лечения различных психических заболеваний (например, расстройств шизофренического спектра). Несмотря на то, что данные препараты оказывают выраженное влияние на поведение животных в простых поведенческих тестах, их эффект часто трудно отличить от действия других препаратов, угнетающих центральную нервную систему, например, седативных средств. В настоящей работе предложен метод анализа структуры поведенческих паттернов у крыс с использованием приема цветового кодирования видеоряда на примере эффектов типичного нейролептика галоперидола в тесте “Открытое поле”. Эксперименты были выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г. С помощью языка программирования Python в среде Google Colab 3-минутные видеозаписи поведения крыс в тесте “Открытое поле” обрабатывали с применением библиотеки OpenCV. Цветовое кодирование позволило маркировать разными цветами и совмещать в одном кадре настоящее ( $t = 0$ ), ближайшее будущее ( $t = 0.33$  с) и несколько более отдаленное будущее положение животного в пространстве ( $t = 1.66$  с). При использовании предлагаемого метода было обнаружено специфическое влияние галоперидола на паттерн поведения крыс, не выявляемое с использованием традиционных подходов к анализу поведения животных в данном тесте. Примененный метод цветового кодирования с использованием трех временных точек показал эффективность для анализа и обработки данных, оказавшись сопоставимым с ранее описанными в литературе подходами с применением как традиционных, так и компьютеризированных методов визуализации.

**Ключевые слова:** цветовое кодирование, поведенческие тесты, открытое поле, галоперидол, антипсихотики

**DOI:** 10.31857/S0869813923020085, **EDN:** NDUCZC

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из распространенных и не до конца изученных психических расстройств, которым страдает около 1% населения, является шизофрения [1]. Несмотря на то, что механизмы ее развития не вполне понятны, предложен ряд фармакологических мишеней, действуя на которые, антипсихотические средства могут купировать симптомы этого заболевания [2]. Тем не менее, используемые в настоящее время препараты не оправдывают в полной мере ожидания врачей и пациентов, поскольку недостаточно действуют на так называемые “минус”-симптомы и когнитивные нарушения. Более того, при приеме типичных антипсихотических средств у больных неизбежно развиваются такие нежелательные лекарственные реакции, как паркинсонизм и дистония [3]. Все это определяет важность поиска новых препаратов, направленных на лечение шизофрении.

Для выполнения данной задачи необходимы эффективные методы скрининга новых потенциально активных соединений. Большое значение имеют поведенческие тесты с использованием мелких лабораторных животных, поскольку такие эксперименты моделируют отдельные аспекты реальной клинической ситуации. Кроме того, поведенческие тесты не требуют больших материальных затрат, позволяя при этом ответить на вопрос, является ли изучаемое соединение психоактивным [4].

Выявление именно антипсихотической активности у потенциальной молекулы не является рутинной задачей. Так, если действие анксиолитических или, например, седативных препаратов можно выявить в тестах “Открытое поле” (ОП) или “Приподнятый крестообразный лабиринт” без какой-либо подготовки испытуемых животных, то в случае потенциального нейролептика необходимо предварительное моделирование шизофрении. На сегодняшний день предложено множество моделей этого заболевания, которые можно разделить на фармакологические, хирургические и генетические [5]. Каждая из моделей достаточно неплохо отражает те или иные симптомы шизофрении у людей, однако все они требуют затрат времени экспериментатора и, самое главное, расхода лабораторных животных.

Возникает справедливый вопрос: возможно ли выявление специфического антипсихотического действия у препарата с использованием простых поведенческих установок без предварительного моделирования заболевания? Для этого необходим поиск новых подходов к анализу данных, получаемых в ходе видеорегистрации поведения животных. Важно, что одной из основных трудностей в интерпретации результатов поведенческих тестов остается субъективность оценки тех или иных критериев разными исследователями, а также излишнее упрощение и однонаправленность выбранных методов анализа [6].

В настоящем исследовании использован метод выявления динамических паттернов поведения с помощью цветового кодирования видеоряда для анализа влияния галоперидола на поведение у лабораторных крыс в тесте ОП. Галоперидол был выбран в качестве эталонного типичного антипсихотика, обладающего сильным антипсихотическим действием без выраженного седативного эффекта [7, 8]. В качестве установок для оценки поведения испытуемых животных был выбран тест ОП как наиболее простой и часто используемый при изучении поведения мелких лабораторных животных [9].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 20 белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г. Крыс содержали в стандартных условиях при 12-часовом цикле свет/темнота и со свободным доступом к воде и корму.

Животные были разделены на 2 группы (опытная и контрольная) по 10 особей. Опытным животным вводили раствор галоперидола (ООО “Велфарм”, Россия) внутрибрюшинно в дозе 0.3 мг/кг в объеме 0.5 мл. В качестве контроля вводили физиологический раствор в том же объеме. Время экспозиции препарата составляло 20 мин [10], после чего крысу помещали в установку ОП (ООО “НПК Открытая наука”, Россия), представлявшую собой круглую арену черного цвета диаметром 97 см, расчерченную на 19 одинаковых по площади сегментов и оборудованную отверстиями в полу. Видеорегистрацию проводили в течение 3 мин с помощью камеры Canon 5D (Canon Inc., Япония) при частоте 30 кадров в секунду и уровне освещенности 250 люкс (с равномерным освещением всей площади арены без градиента освещенности). Участок помещения с тестовой установкой ограничивали от остального рабочего пространства при помощи однотонных медицинских ширм. Управление работой камеры происходило удаленно при помощи программного обеспечения EOS Utility (Canon Inc., Япония); изображение выводилось на монитор экспериментатора.

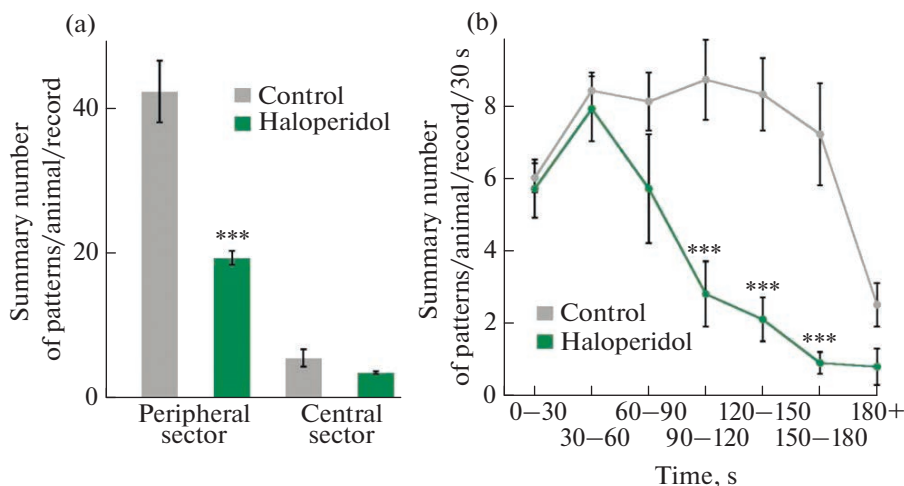
При анализе видеоматериалов фиксировали следующие поведенческие паттерны: повороты головы/туловища вправо, влево, движение вперед, разворот назад, стойка на задних лапах с опорой на стенку и без опоры, обследование отверстий, обнюхивание пространства, груминг и замирание. Валидация общей активности на основе подсчета паттернов производилась стандартным методом ручного подсчета пересечений секторов. Часть видеозаписей просматривали в исходном виде, при этом выделяли и фиксировали основные паттерны. Далее с помощью языка программирования Python в среде Google Colab записи обрабатывали с применением библиотеки OpenCV. При помощи цветового кодирования отображали различными цветами и совмещали в одном кадре настоящее ( $t = 0$ ), ближайшее будущее ( $t = 0.33$  с) и несколько более отдаленное будущее ( $t = 1.66$  с) положения животного.

Статистическую обработку данных проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента или  $U$ -критерия Манна–Уитни при помощи программ PAST 4.03 и Excel 2016 (Microsoft, США). Нормальность распределения данных в выборках определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. При изучении зависимости двигательной активности от фактора времени использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA для повторных изменений с последующим попарным сравнением *post hoc* на основе критерия Тьюки. Различия между группами признавались статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Данные на столбчатых диаграммах приведены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Тест ОП позволяет оценить двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности у крыс и мышей [11]. Анализ двигательных поведенческих паттернов является основой для теста ОП, поэтому в первую очередь из всего комплекса выявленных паттернов исследовали именно двигательные.

Среди локомоторных паттернов для оценки общей двигательной активности в центре и на периферии арены были учтены: повороты на  $180^\circ$ , вправо, влево, движение вперед, а также переориентация головы вправо, влево и вперед. Статистически значимые отличия в двигательной активности контрольных и получавших галоперидол животных были получены только на периферии арены. В группе галоперидола двигательная активность оказалась достоверно ниже: суммарное число паттернов за все время записи составило  $19.3 \pm 1.2$  по сравнению с  $42.2 \pm 4.2$  в контрольной группе ( $p < 0.001$ ) (рис. 1а).



**Рис. 1.** Общая двигательная активность в группах контроля и галоперидола. (a) – Среднее суммарное число двигательных паттернов в периферийных и центральных сегментах “Открытого поля” в контрольной группе и группе галоперидола за все время записи (3 мин). (b) – Изменение двигательной активности животных в контрольной группе и группе галоперидола в тесте “Открытое поле” в течение последовательных 30-секундных отрезков времени. \*\*\* –  $p < 0.001$ .

Стандартный метод определения двигательной активности с помощью подсчета пересечений секторов выявил ту же закономерность:  $92.3 \pm 10.5$  и  $32.9 \pm 4.9$  пересечений секторов в группе контроля и галоперидола соответственно ( $p < 0.001$ ). Разница в количестве пересечений секторов для одной и той же группы объясняется на уровне подходов: при подсчете выбранных нами паттернов события фиксируются только при инициализации действий, после которых животное может продолжать движение, пересекая несколько секторов. В перспективе можно использовать оба метода для выявления нарушений в структурах, ответственных за инициализацию и планирование движений. В центральных сегментах в это же время четко прослеживалась гораздо более низкая локомоторная активность; статистически значимых отличий в центре поля между группами обнаружено не было (рис. 1a).

Беспокойное поведение (тревожность) во многих исследованиях определяется по относительной длительности нахождения животных на открытом пространстве или в центре арены по сравнению с локализацией у стенок или в укрытии [12], хотя в целом факт предпочтения периферии объясняется стремлением грызунов избегать освещенных и открытых пространств [9].

На рис. 1b представлены средние суммы паттернов за каждые последующие 30 с эксперимента. Таким образом, общее время записи было сведено к 7 временным зонам. Прослеживалась динамика подъемов и спадов двигательной активности, однако в течение первой минуты эксперимента активность у животных обеих групп была статистически неотличима. Начиная со второй минуты, у животных, получивших галоперидол, наблюдалось заметное снижение активности. В контрольной группе аналогичное снижение также имело место, однако наблюдалось оно лишь на последней минуте записи, где средние числа паттернов у крыс обеих групп вновь сближались.

Данная тенденция к снижению активности могла быть следствием того, что на фоне галоперидола развивался дофаминергический дефицит, косвенно влияющий

на локомоцию и вызвавший гипокинезию. Нейротрансмиттер дофамин играет важную роль в модуляции моторных функций [13], и дефицит дофамина или блокада дофаминовых рецепторов приводят к развитию ряда патологических форм поведения, в том числе и касающихся локомоторной активности [14].

Путем дисперсионного анализа для повторных измерений обнаружена достоверная разница между группами, усиленная фактором времени ( $p < 0.001$ ), а с помощью попарного *post hoc* анализа на основе критерия Тьюки было установлено, что динамика активности исследованных групп статистически значимо отличается в периоды: 90–120, 120–150 и 150–180 с ( $p < 0.001$ ). Иными словами, животные, получавшие галоперидол, гораздо раньше переставали передвигаться по ОП, чем контрольные особи.

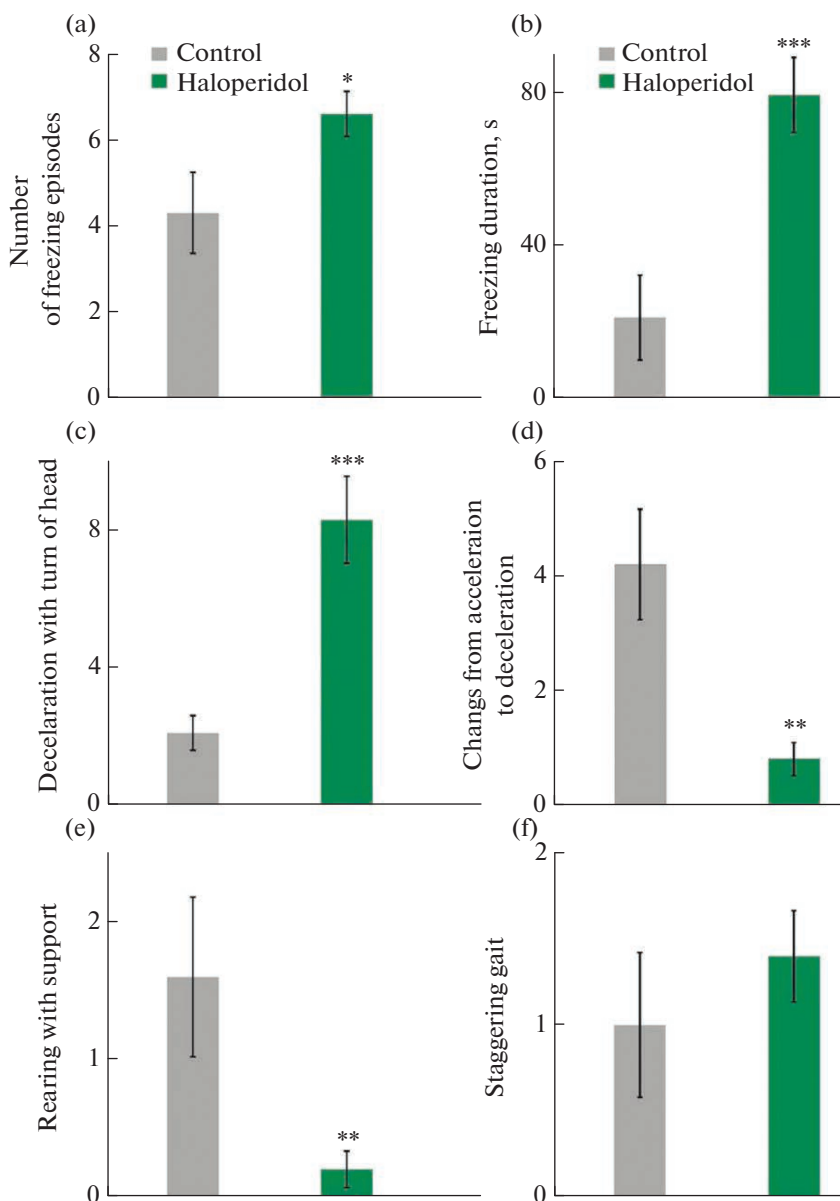
Ранее было выявлено, что галоперидол, как и многие другие типичные антипсихотики, обладает значительным побочным влиянием на двигательную активность и вызывает выраженные экстрапирамидные расстройства, что клинически проявляется тремором, брадикинезией, ригидностью мышц и др. [15]. Данное обстоятельство не могло не сказаться на характере активности крыс. Частота и длительность случаев замирания в группах контроля и галоперидола статистически значимо различались (рис. 2а и 2б). В целом, движения на фоне действия галоперидола были несколько замедлены и сопровождалась, как было сказано выше, поворотами головы (рис. 2с). Эпизоды периодического ускорения и замедления нередко наблюдались также и в группе контроля, поскольку являются элементом нормальной локомоции у крыс [16–18]. Однако важно отметить, что чередования ускорения и замедления отмечалось в группе, получавшей галоперидол, значительно реже, чем в контроле, что указывает на появление выраженной стереотипности и монотонности локомоции под влиянием препарата (рис. 2д). Однообразие поведения, и, вероятно, связанное с ним снижение поисковой деятельности, проявлялись более редким совершением стоек на задних лапах с опорой (рис. 2е) ( $4.5 \pm 1.0$  и  $1.3 \pm 0.4$  для групп контроля и галоперидола соответственно,  $p < 0.01$ ), а также снижением числа обнюхиваний отверстий (лунок) в арене ( $6.9 \pm 1.9$  в группе контроля и  $2.0 \pm 0.8$  в группе галоперидола,  $p < 0.05$ ).

В то же время для остальных общепринятых поведенческих паттернов, таких как стойка на задних лапах без опоры, принюхивание к воздуху как одним из проявлений ориентировочного рефлекса, а также груминг, различия не были выявлены.

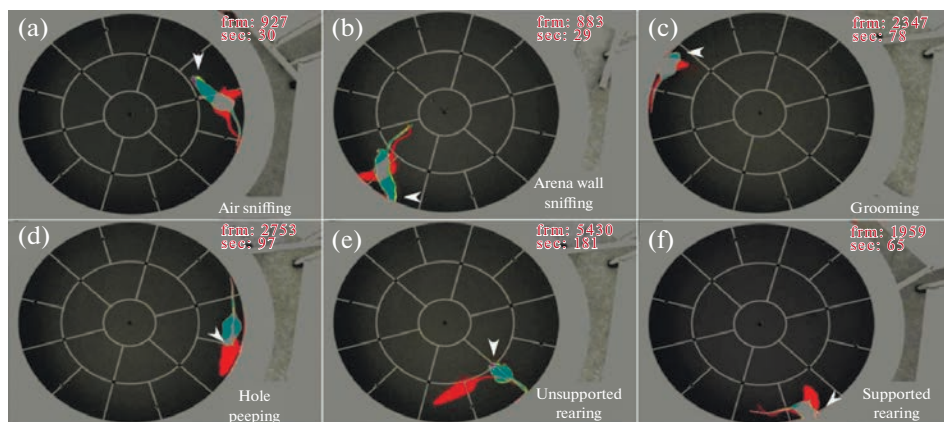
Применение метода временного кодирования, позволяющего совместить в одном кадре три последовательных состояния: в настоящем, близком (через 0.33 с) и более отдаленном (через 1.66 с) будущем, позволило наиболее объективно (насколько это возможно в принципе) зафиксировать то или иное поведенческое событие. Примеры поведенческих паттернов, выявленных с помощью цвето-временного кодирования, показаны на рис. 3.

Так, на рис. 3а показан типичный пример кратковременного принюхивания к воздуху (желтым, стрелка), которое быстро сменяется иным поведением (красным). Аналогичным образом выглядит обнюхивание стенок arenas (3б, желтым, стрелка) с той разницей, что оно продолжает происходить и в отдаленном будущем, со смещением (красным). Типичный пример груминга отражен на панели (с), а исследование отверстия — на панели (d). Панели (е) и (f) демонстрируют кратковременные (только серым, стрелки) стойки без опоры и с опорой на стенку, в обоих случаях сменившиеся в будущем иными типами поведения (красным).

Вышеперечисленные показатели поведенческой активности, как правило, говорят о степени ориентировочно-исследовательской активности, тревожности животных и об эмоциональной составляющей как таковой. Так, исследование, проведенное Звездочкиной с соавт. [14], выявило выраженное снижение ориентировочно-исследовательского поведения у крыс в тесте ОП после введения галоперидола,



**Рис. 2.** Частота некоторых поведенческих паттернов, наблюдаемых у крыс в тесте “Открытое поле” в группах контроля и галоперидола. (a) – Среднее число эпизодов замирания на месте. (b) – Суммарная длительность эпизодов замирания. (c) – Число эпизодов замедления в движении с одновременными поворотами головы или “кивками” ею. (d) – Число случаев чередования ускорения и замедления. (e) – Среднее число стоек на задних лапах, совершенных без опоры на стенку арены. (f) – Случаи шаткой, неуверенной или “хромающей” походки. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .



**Рис. 3.** Типичные примеры некоторых поведенческих паттернов, отображенных при помощи цвето-временного кодирования в настоящем, близком (через 0.33 с) (серым и желтым) и более отдаленном (через 1.66 с) (красным) будущем. (а) — Принюхивание к воздуху над ареной. (б) — Обнюхивание стенок арены. (с) — Груминг. (д) — Исследование отверстия в поверхности арены. (е) — Стойка без опоры на стенку арены. (ф) — Стойка с опорой на стенку арены. Стрелками отмечены области, принципиальные для идентификации того или иного паттерна.

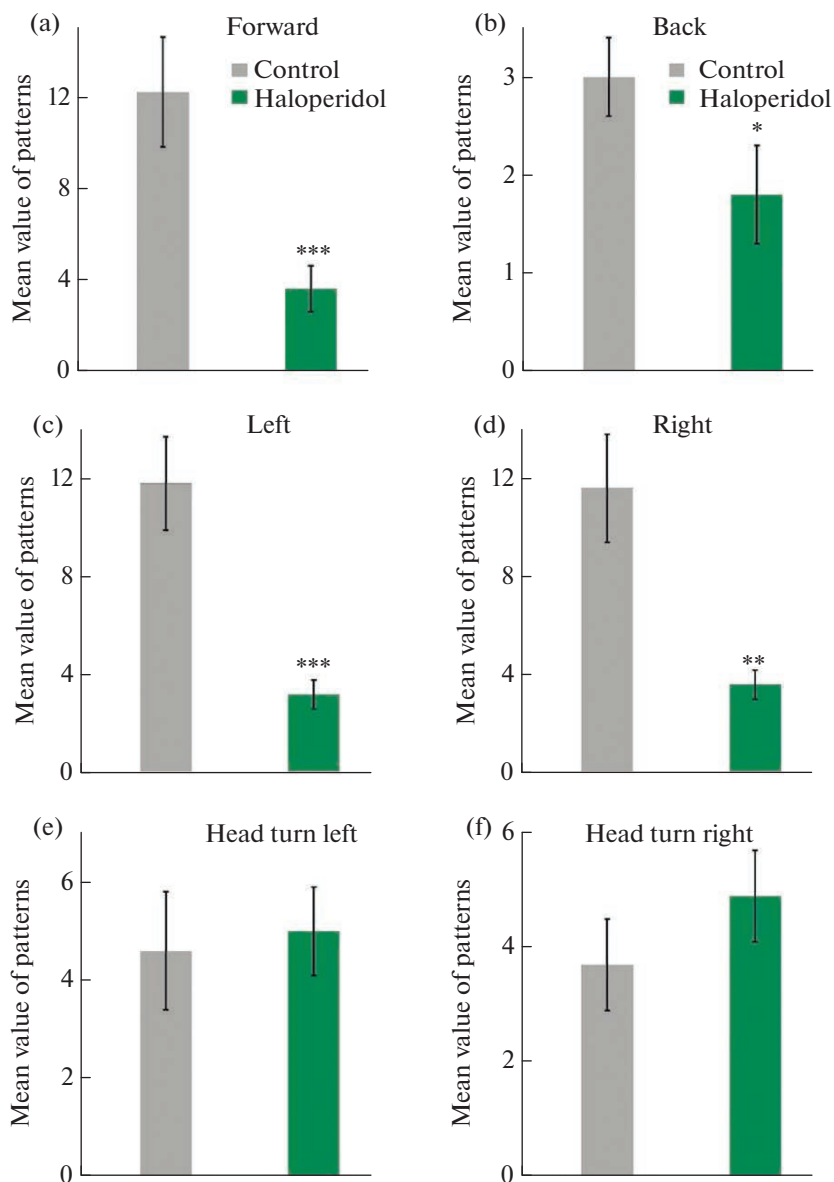
а также снижение частоты паттерна груминга, что свидетельствовало о повышении тревожности животных и развитии тормозных процессов в ЦНС.

Однако такой показатель, как груминг, нельзя определить в качестве однозначного маркера тревоги, поскольку он также может означать комфортное и спокойное состояние, в котором пребывает животное. Исходя из этого, изменчивость такого параметра не стоит рассматривать в качестве маркерного показателя эффекта галоперидола или какого-либо другого психоактивного соединения. Нельзя также отрицать, насколько большую роль играет эмоциональная составляющая в двигательных функциях, поскольку было выяснено, что именно мезокортиколимбический путь модулирует реакции, которые связаны со страхом и тревожностью [19].

К сожалению, учет таких параметров поведения затруднен и сопряжен с риском чрезмерной субъективности оценок. Гораздо более эффективным и обоснованным представляется анализ простых двигательных паттернов, интерпретация которых однозначна. К ним относятся: движение вперед, разворот на 180°, повороты влево и вправо, а также повороты головы. На рис. 4а–f отражено попарное сравнение этих двигательных паттернов у двух групп крыс. Статистический анализ показал, что различия значимы для всех паттернов, кроме поворотов головы.

Среднее количество движений вперед в контрольной группе составило  $12.2 \pm 2.4$  против  $3.6 \pm 1.0$  в группе галоперидола ( $p < 0.01$ ) (рис. 3а), разворотов на 180° —  $3.3 \pm 0.4$  против  $1.8 \pm 0.5$  в группе галоперидола ( $p < 0.05$ ) (рис. 3б), поворотов вправо или влево —  $11.8 \pm 1.9$  и  $11.6 \pm 2.2$  против  $3.2 \pm 0.6$  и  $3.6 \pm 0.6$  соответственно в группе галоперидола ( $p < 0.001$  и  $p < 0.01$  соответственно) (рис. 3с, д). В совокупности эти данные явно указывают на сниженную базовую локомоторную активность, включающую в себя движение вперед и повороты, в то время как другие моторные акты (повороты головы), ориентировочные рефлексы и общий уровень тревожности остаются примерно одинаковыми.

Однако остается открытым вопрос о том, в какой мере текущее положение животного или его легкое смещение в течение 0.3 с, может служить предиктором дальнейшего движения. Иными словами, есть ли связь между вектором кратковре-



**Рис. 4.** Среднее число простых локомоторных событий, зарегистрированных в группах контроля и галоперидола. (a) – Движение вперед. (b) – Разворот на 180°. (c) – Поворот корпуса влево. (d) – Поворот корпуса вправо. (e) – Поворот головы влево. (f) – Поворот головы вправо. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

менного смещения и вектором более отдаленного движения? И в том случае, если такая зависимость существует среди интактных животных, то в какой мере она сохраняется или нарушается под влиянием галоперидола?

Так, благодаря цветовому кодированию, соответствующему трем вышеуказанным временным точкам, нами была сделана попытка предсказать будущее положение животных по определенным закономерностям. Для этого нами были выбраны

4 паттерна в отсроченном будущем: движение вперед, разворот на  $180^\circ$ ; повороты вправо или влево. Согласно этому набору, собранные данные были разделены на четыре соответствующие группы.

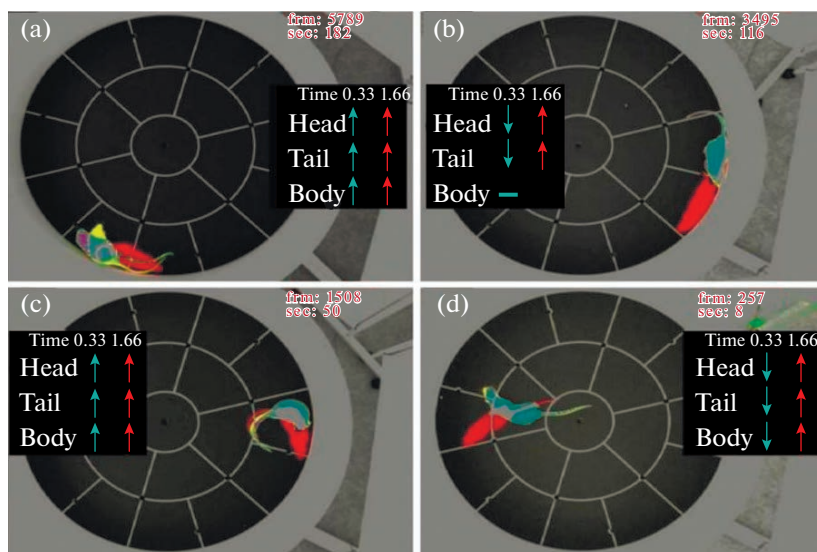
Далее нами было выдвинуто предположение, что поворот головы, хвоста или корпуса животного в ту или иную сторону служит признаком, по которому можно определять вероятность возникновения тех или иных паттернов в будущем, отстоящем на 1.66 с. Также обратило на себя внимание то, что животные зачастую поворачивают хвост и/или голову в направлении будущего движения. Поэтому для анализа было выбрано 3 этих фактора в настоящем и ближайшем будущем. Каждый из факторов соотносился с будущим поведением следующим образом: обращены ли голова, хвост или корпус животного в ту же сторону, куда оно направится через 1.66 с, а именно: вперед, назад, вправо или влево.

На рис. 5 показаны примеры того, каким образом производилась сортировка в соответствии с указанными факторами. Панель (а) рисунка демонстрирует сдвиг (желтым) головы, хвоста и всего корпуса, примерно сонаправленный будущему положению (красным). На панели (b) показано очень небольшое противонаправленное смещение головы и хвоста (желтым) относительно будущего (красным). Панель (с) демонстрирует выраженную сонаправленность, тогда как панель (d) — слабую противонаправленность.

Голова, хвост и корпус животных чаще всего принимали независимое положение, поэтому для дальнейшего анализа рассматривались отдельно. При анализе полученных данных относительно положения головы, хвоста и туловища в качестве предсказательных критериев будущего движения были выявлены разнообразные тенденции, которые существенно варьировали от одного животного к другому, а также между основными видами локомоции: движения вперед, назад, поворотов влево и вправо. Однако зависели ли эти тенденции от действия галопериодола? Для ответа на этот вопрос было необходимо вычислить соотношение сонаправленности и противонаправленности у каждого животного в каждом из двигательных паттернов. Так как отсутствовали какие-либо убедительные основания для рассмотрения левых и правых поворотов по отдельности, они были объединены в общий паттерн. При анализе прямолинейного движения примерно в равном числе случаев голова, хвост и корпус занимали сонаправленное и противонаправленное положения. Однако в иных случаях эти части тела чаще занимали положение, противонаправленное движению, чем сонаправленное ему. В связи с этим была применена пропорция противонаправленности к сонаправленности, а не наоборот, хотя принципиального значения это не имело. Таким образом, вычислялся своеобразный “индекс направленности”, который представлял собой пропорцию суммарного числа противонаправленных положений головы, хвоста и корпуса к сонаправленным для каждого из трех двигательных паттернов: движение вперед, назад, поворот. Все пропорции вычислялись индивидуально для каждого животного, после чего были сведены в таблицу.

Алгоритм расчета “индекса направленности”:

1. Отбирались паттерны движения вперед, разворота, поворотов вправо или влево.
2. Для каждого животного в каждом паттерне учитывались положение головы, туловища и хвоста как в настоящем и ближайшем будущем (0.33 с) времени, так и в дальнем будущем (т.е. через 1.66 с). Если положение какой-то из частей тела в настоящем и ближайшем будущем времени совпадало с положением той же части тела в дальнем будущем, то это движение называлось сонаправленным, в противном случае — противонаправленным. Например, на рис. 5b видно, как голова, туловище и хвост развернуты вправо, значит, в паттерн поворота для данного животного мы добавляем по одному сонаправленному движению для каждой части тела.



**Рис. 5.** Примеры сонаправленного и противонаправленного смещения головы, хвоста и корпуса крыс в настоящем и через 0.33 с (серым и желтым) относительно положения через 1.66 с (красным). (a) — Пример разворота на 180°. (b) — Пример движения вперед. (c, d) — Примеры поворотов вправо и влево.

3. Далее для каждого животного в каждом из паттернов для каждой части тела суммировалось количество сонаправленных и противонаправленных движений, затем рассчитывалось отношение противонаправленных движений к сонаправленным.

В таком виде данные приняли удобный вид для проведения двухфакторного сравнения. Первый фактор отражал индексы направленности для головы, хвоста и туловища, распределенные между строками с 1-й по 10-ю (для головы), с 11-й по 20-ю (для хвоста) и с 21-й по 30-ю (для корпуса). Второй фактор соответствовал группам (контроль или галоперидол), расположенным в двух колонках. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа, проведенного в среде MATLAB R2020a, представлены в табл. 1–3.

Из табл. 1 следует, что при движении вперед индекс направленности достоверно зависел от частей тела животных, которые вели себя по-разному. В то же время введение галоперидола никак не влияло на пропорцию противонаправленности к сонаправленности (рис. 6) — соответственно, не было и взаимодействия между факторами.

Из табл. 2 следует, что фактор группы животных (контроль или галоперидол) статистически значимо ( $p < 0.01$ ) влияет на индекс направленности. В то же время фактора влияния положения головы, хвоста или корпуса, а также их взаимодействия с группой животных не отмечалось. Следовательно, гипотеза о влиянии галоперидола на планирование паттерна будущей локомоции подтверждается — после введения галоперидола противонаправленность относительно будущего движения перестает доминировать над сонаправленностью, как это наблюдается в контроле (рис. 6).

Наконец, табл. 3, в которой объединены сведения о поворотах влево и вправо, демонстрирует очень высокий уровень статистической значимости того, что индекс направленности зависит от принадлежности животных к одной из групп. Тем не менее, эффект связан и с положением конкретной части тела животного: головы,

**Таблица 1.** Двухфакторный дисперсионный анализ движения вперед (контроль/галоперидол)

| Движение вперед           | Сумма квадратов (SS) | Степени свободы (df) | Дисперсия (MS) | F-критерий | Вероятность Prob > F |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------|------------|----------------------|
| Столбцы (группа животных) | 0.0001               | 1                    | 0.00009        | 0          | 0.99                 |
| Строки (часть тела)       | 27.85                | 9                    | 3.1            | 2.97       | 0.01                 |
| Взаимодействие            | 7.8                  | 9                    | 0.9            | 0.8        | 0.6                  |
| Ошибка                    | 41.7                 | 40                   | 1.04           |            |                      |
| Итого                     | 77.4                 | 59                   |                |            |                      |

**Таблица 2.** Двухфакторный дисперсионный анализ движения назад (контроль/галоперидол)

| Движение назад            | Сумма квадратов (SS) | Степени свободы (df) | Дисперсия (MS) | F-критерий | Вероятность Prob > F |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------|------------|----------------------|
| Столбцы (группа животных) | 10.5                 | 1                    | 10.5           | 10.7       | 0.002                |
| Строки (часть тела)       | 16.1                 | 9                    | 1.8            | 1.9        | 0.1                  |
| Взаимодействие            | 15.4                 | 9                    | 1.7            | 1.7        | 0.1                  |
| Ошибка                    | 39.5                 | 40                   | 0.99           |            |                      |
| Итого                     | 81.6                 | 59                   |                |            |                      |

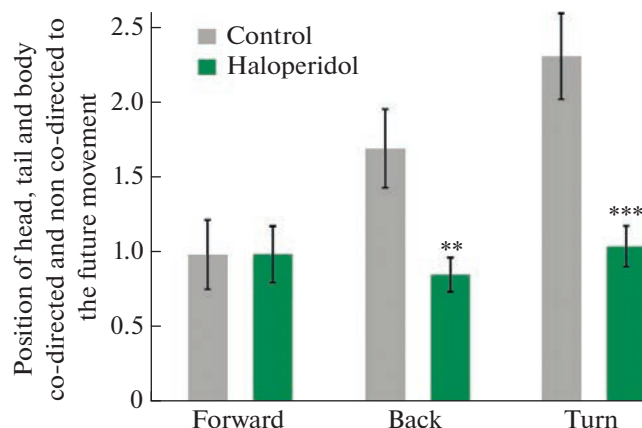
**Таблица 3.** Двухфакторный дисперсионный анализ поворотов влево или вправо (контроль/галоперидол)

| Повороты                  | Сумма квадратов (SS) | Степени свободы (df) | Дисперсия (MS) | F-критерий | Вероятность Prob > F |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------|------------|----------------------|
| Столбцы (группа животных) | 47.85                | 1                    | 47.85          | 30.05      | 0.0000005            |
| Строки (часть тела)       | 126.7                | 19                   | 6.7            | 4.19       | 0.000003             |
| Взаимодействие            | 100.3                | 19                   | 5.3            | 3.32       | 0.0001               |
| Ошибка                    | 127.4                | 80                   | 1.6            |            |                      |
| Итого                     | 402.2                | 119                  |                |            |                      |

хвоста или корпуса. Более того, между указанными факторами наблюдается статистически значимое взаимодействие и, таким образом, эффект галоперидола в наибольшей степени отражается на положении головы и корпуса и в меньшей степени — на положении хвоста. Но в любом случае, как и при движении назад, введение галоперидола резко снижает частоту противонаправленного положения частей тела перед поворотами (рис. 6, справа).

Таким образом, можно утверждать, что галоперидол в гораздо большей степени, по сравнению с контролем, ассоциируется с сонаправленной ориентацией тела при поворотах в стороны и разворотах назад, тогда как при движении прямо он не оказывает никакого воздействия (рис. 6). Иными словами, в определенных случаях животное становится более предсказуемым, что может быть связано с брадикинезией, вызванной галоперидолом.

Установлено, что антагонист дофаминовых D<sub>2</sub>-рецепторов галоперидол при внутрибрюшинном введении крысам-самцам вызывает двигательный дефицит в тесте



**Рис. 6.** Индекс направленности головы, хвоста и корпуса крыс в тесте “Открытое поле” перед одним из простых локомоторных паттернов: движения вперед, назад (с разворотом на 180°) и поворотами влево или вправо. Индекс направленности рассчитывался индивидуально для каждого животного и для каждого из локомоторных паттернов путем деления числа противонаправленных локаций головы, хвоста или корпуса на число сонаправленных положений. Различия между группами контроля и галоперидола статистически достоверны для разворотов назад и поворотов влево или вправо, но не для движения вперед (см. табл. 1–3), \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

“Открытое поле”, особенно во второй половине периода тестирования (90–180 с). Обнаружено снижение двигательной активности вплоть до ее полного отсутствия как в центре, так и на периферии арены. Выявлены случаи неустойчивости позы и замедленности движений под воздействием галоперидола, а также периодические эпизоды довольно длительного замирания. Все вышеперечисленные наблюдения предварительно указывают на вероятность проявления двигательных нарушений, сходных с таковыми при болезни Паркинсона, что косвенно указывает на блокаду дофаминовых рецепторов в nigrostriарном пути под влиянием галоперидола [20].

Примененный нами метод цветового кодирования с использованием трех временных точек показал эффективность в анализе и обработке данных. Полученные результаты соответствуют литературным данным, в которых применяли как традиционные, так и компьютеризированные методы визуализации. Неоспоримым преимуществом метода является то, что метод открывает новые возможности в работе с биологическими изображениями при использовании относительно несложной методики, расширяя аналитический арсенал исследователя и снижая степень человеческого фактора за счет объективизации процесса. Он позволяет регистрировать достаточно мелкие движения и визуализировать динамику объектов, совмещенных в одном кадре. Мы считаем, что данный метод в комплексе с другими поможет точнее и быстрее производить оценку эффектов психоактивных соединений при проведении их фармакологического скрининга.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено в соответствии с принципами Базельской декларации, Приказа Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и рекомендациями биоэтической комиссии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Минздрава России.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Аналитический центр Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Минздрава России” в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 г. при финансовой поддержке Минобрнауки России. Работа выполнена в рамках проекта № 73025408 Санкт-Петербургского государственного университета.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harris L, Wayland P, Umrana Y, Krishnamurthy D, Rahmoune H, Bahn S (2013) Schizophrenia: metabolic aspects of aetiology, diagnosis and future treatment strategies. *Psychoneuroendocrinology* 38(6): 752–766.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.09.009>
2. Калитин КЮ, Спасов АА, Муха ОЮ, Придворов ГВ, Липатов ВА (2021) Фармакологические мишени и механизм действия антипсихотических средств в рамках нейробиологической теории патогенеза шизофрении. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 107(8): 927–954. [Kalitin KY, Spasov AA, Mukha OU, Pridvorov GV, Lipatov VA (2021) Pharmacological Targets and the Mechanism of Action of Antipsychotic Agents in the Framework of the Neurochemical Theory of the Pathogenesis of Schizophrenia. *Russ J Physiol* 107(8): 927–954. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.31857/S0869813921080070>
3. Vaiman EE, Shnayder NA, Khasanova AK, Strelnik AI, Gayduk AJ, Al-Zamil M, Sapronova MR, Zhukova NG, Smirnova DA, Nasyrova RF (2022) Pathophysiological Mechanisms of Antipsychotic-Induced Parkinsonism. *Biomedicine* 10(8): 2010.  
<https://doi.org/10.1007/s40120-018-0105-0>
4. Дроздов АЛ, Демченко ЕМ, Эйяд А, Неруш ОП (2011) Влияние психотропных лекарственных средств на спонтанную поведенческую активность белых крыс. *Вісник Дніпропетр універ. Біологія. Медицина* 2(1): 47–53. [Drozdov AL, Demchenko EM, Ejyad A, Nerush OP (2011) Influence of psychotropic drugs on spontaneous behavioral activity of albino rats. *Visn Dnipropetr Univ Ser Biol Med* 2(1): 47–53. (In Russ)].  
<https://doi.org/10.15421/021108>
5. Bialoni M, Wasiak A (2022) Advantages and Limitations of Animal Schizophrenia Models. *Int J Mol Sci* 23(11): 5968.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23115968>
6. Tecott LH, Nestler EJ (2004) Neurobehavioral assessment in the information age. *Nat Neurosci* 7(5): 462–466.  
<https://doi.org/10.1038/nn1225>
7. Дробизhev МЮ, Овчинников АА (2012) Зачем нужна современная классификация антипсихотиков? *Рос мед журн* 20(29): 1449–1457. [Drobizhev MYu, Ovchinnikov AA (2012) Why a contemporary classification of antipsychotics is needed? *Rus Med J* 20(29): 1449–1457. (In Russ)].
8. Irving CB, Adams CE, Lawrie S (2013) Haloperidol versus placebo for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* (11): CD003082.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD003082.pub3>
9. Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463(1–3): 3–33.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
10. Sysyoev YI, Shits DD, Puchik MM, Prihodko VA, Idiyatullin RD, Kotelnikova AA, Okovityi SV (2022) Use of Naïve Bayes Classifier to Assess the Effects of Antipsychotic Agents on Brain

- Electrical Activity Parameters in Rats. *J Evol Biochem Phys* 58: 1130–1141.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093022040160>
11. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P (2002) Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res* 134(1–2): 49–57.  
[https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00452-1](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00452-1)
  12. Wahlsten D (2011) Mouse behavioral testing. How to use mice in behavioral neuroscience. Acad Press. Cambridge (MA).
  13. Zhai S, Shen W, Graves SM, Surmeier DJ (2019) Dopaminergic modulation of striatal function and Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 126(4): 411–422.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-019-01997-y>
  14. Звездочкина НВ, Муранова ЛН, Андрианов ВВ, Архипова СС, Гайнутдинов ХЛ, Голубев АИ, Пleshchinskii ИИ (2004) Локомоторные реакции и возбудимость нейронов в условиях блокады дофамина галоперидолом у беспозвоночных и позвоночных животных. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 90(11): 1381–1392. [Zvezdochkina NV, Muranova LN, Andrianov VV, Arkhipova SS, Gaynutdinov KhL, Golubev AI, Pleshchinskiy IN (2004) Locomotor reactions and excitability of neurons during the blockade of dopamine by haloperidol in vertebrate and invertebrate animals. *Russ J Physiol* 90(11): 1381–1392. (In Russ)].
  15. Strange PG (2008) Antipsychotic drug action: antagonism, inverse agonism or partial agonism. *Trends Pharmacol Sci* 29(6): 314–321.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.03.009>
  16. Alves JA, Boerner BC, Laplagne DA (2016) Flexible Coupling of Respiration and Vocalizations with Locomotion and Head Movements in the Freely Behaving Rat. *Neural Plast* 2016:4065073.  
<https://doi.org/10.1155/2016/4065073>
  17. Bouët V, Borel L, Harlay F, Gahéry Y, Lacour M (2004) Kinematics of treadmill locomotion in rats conceived, born, and reared in a hypergravity field (2 g). Adaptation to 1 g. *Behav Brain Res* 150(1–2): 207–216.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00258-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00258-4)
  18. Шишелова АЮ, Алиев РР, Раевский ВВ (2015) Ранний сенсорный опыт определяет разнообразие исследовательского поведения в зрелом возрасте. *Экспер психол* 8(1): 73–84. [Shishelova AYU, Aliev RR, Raevsky VV (2015) Early sensory experience determines variety of exploratory behavior in adult age. *Exp Psychol (Russia)* 8(1): 73–84. (In Russ)].
  19. de Souza Caetano KA, de Oliveira AR, Brandão ML (2013) Dopamine D2 receptors modulate the expression of contextual conditioned fear: role of the ventral tegmental area and the basolateral amygdala. *Behav Pharmacol* 24(4): 264–274.  
<https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32836356c4>
  20. Amtage J, Schmidt WJ (2003) Context-dependent catalepsy intensification is due to classical conditioning and sensitization. *Behav Pharmacol* 14(7): 563–567.  
<https://doi.org/10.1097/00008877-200311000-00009>

### Use of Colour Coding to Assess the Effects of Haloperidol on Animal Behaviour in the Open Field Test

M. S. Makarov<sup>a</sup>, Yu. I. Sysoev<sup>b, c, d, e, \*</sup>, M. K. Guzenko<sup>a</sup>, V. A. Prikhodko<sup>b, e</sup>,  
E. Korkotian<sup>a, f, \*\*,</sup> and S. V. Okovityi<sup>b, e</sup>

<sup>a</sup> Perm State National Research University, Perm, Russia

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

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

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

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

<sup>f</sup> Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

\*e-mail: susoyev92@mail.ru

\*\*e-mail: eduard.korkotian@weizmann.ac.il

Development of novel approaches to behavioural test data analysis is of considerable importance to fundamental research as well as experimental neuropharmacology. Antipsychotic agents used to treat positive and negative symptoms in schizophrenia are of particular interest to current research. Despite that antipsychotics exert potent effects on

animal behaviour in simple behavioural tests, they can be difficult to distinguish from other central nervous system-depressing agents, such as sedatives. In this paper, we propose colour coding of video sequence as a method for the analysis of behavioural pattern structure in rats, using the effects of haloperidol, a typical antipsychotic, in the Open field test, as an example. The study was carried out in outbred albino male rats weighing 250–300 g. 3 min long video sequences of rat behaviour in the Open field were processed using Python and the OpenCV library in the Google Colab 3 environment. Colour coding allowed for the marking up and overlaying in a single frame the present ( $t = 0$ ), near-future ( $t = 0.33$  s), and the less-near-future ( $t = 1.66$  s) location of an animal in the arena. Using the proposed method, we were able to detect specific effects of haloperidol on animal behavioural patterns which are undetectable using conventional behavioural data analysis techniques for this test. The three-timepoint colour coding method we propose proved effective for data analysis and processing, and the results were in accordance with other author's data, obtained using computerized as well as conventional visualization techniques.

*Keywords:* colour coding, behavioural testing, Open field, haloperidol, antipsychotics

---

---

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

---

УЧАСТИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА И  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА  
СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

© 2023 г. Е. В. Лопатина<sup>1, 2, \*</sup>, А. В. Гавриченко<sup>1</sup>, Н. А. Пасатецкая<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

\*E-mail: evlopatina@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.09.2022 г.

После доработки 26.11.2022 г.

Принята к публикации 13.01.2023 г.

В последнее время все большее внимание уделяется обсуждению трофической функции нервной системы и ее участию в запуске сигнальных каскадов, регулирующих клеточный метаболизм. В работе оценивали роль ацетилхолина и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в регуляции роста скелетных мышц 10–12-дневных куриных эмбрионов в условиях органотипической культуры ткани. Максимальный трофотропный эффект ацетилхолин проявлял в концентрации  $10^{-8}$  М. Ингибиторный анализ доказал участие никотиновых холинорецепторов в этом эффекте. Оуабаин дозозависимо регулировал рост эксплантатов ткани скелетной мышцы куриных эмбрионов. В концентрациях, сопоставимых с эндогенными, гликозид стимулировал рост экспериментальных эксплантатов на 33% по сравнению с контрольным значением. Обнаружены миотоксические свойства оуабаина в диапазоне концентраций  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М. Ацетилхолин устранял миотоксический эффект оуабаина ( $10^{-6}$  М) как прямо, действуя на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу, так и рецепторопосредовано через никотиновый холинорецептор.

**Ключевые слова:** органотипическая культура ткани, скелетная мышца, ацетилхолин, никотиновый холинорецептор,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза, оуабаин

**DOI:** 10.31857/S0869813923020073, **EDN:** NDTFFO

## ВВЕДЕНИЕ

Классическими методами исследования процессов, происходящих на уровне концевой пластинки, являются электрофизиологические и биохимические методы, позволяющие изучить роль мембранных структур в регуляции функционирования синапса. В последнее время все большее внимание уделяется обсуждению трофической функции нервной системы и запуску сигнальных каскадов, регулирующих клеточный метаболизм. Известно, что ацетилхолин выделяется в синаптическую щель из двигательной нервной терминали в виде порций (квантов) и в “неквантовой” форме (активное тоническое выделение молекул) [1]. При квантовом выделении ацетилхолина его концентрация в синаптической щели достигает сотен мкмоль/л, в случае неквантового освобождения концентрация медиатора поддерживается на наномолярном уровне [2].

Исследования роли ацетилхолина в концентрации, сопоставимой с той, что достигается при его неквантовом выделении, в регуляции нервно-мышечной передачи начались в лаборатории нервно-мышечной физиологии НИИ физиологии

им. А.А. Ухтомского в 90-х годах XX века. На френико-диафрагмальном препарате белой крысы был изучен антиутомляющий эффект низких концентраций ацетилхолина. Исследования показали, что этот эффект не связан с влиянием медиатора на никотиновые или мускариновые холинорецепторы. Кратковременная аппликация ацетилхолина вызывала гиперполяризацию внесинаптической мембраны мышечных волокон. Эта гиперполяризация сохранялась на протяжении длительного времени после удаления ацетилхолина из омывающего мышцу раствора, но отсутствовала на фоне оубаина. Авторы сделали вывод о том, что в основе такой гиперполяризации лежит активация  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы [3–8].

Исследования вопросов, связанных с изучением регуляторной роли ацетилхолина в нервно-мышечном соединении, осуществлялись параллельно в Санкт-Петербургском Университете, под руководством профессора И.И. Кривого, и в Казани в лаборатории биофизики клетки, под руководством академика Е.Е. Никольского. В работе Е.Е. Никольского и соавт. также было показано, что наномолярные концентрации ацетилхолина модулируют насосную функцию  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, что проявляется в локальной гиперполяризации мышечной мембраны [9].

Если вклад ацетилхолина в наномолярных концентрациях в модуляцию нервно-мышечной передачи исследован достаточно подробно [1, 10, 11], то о трофотропных эффектах различных концентраций ацетилхолина сведений крайне мало. В 2020 г. вышла работа, свидетельствующая о том, что ацетилхолин в миллимолярной концентрации обеспечивает трофический сигнал, предотвращающий механизмы коннексин-опосредованной мышечной атрофии [12]. Вопрос о трофической функции низких концентраций ацетилхолина остается открытым.

Важнейшей группой природных регуляторов  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы являются сердечные гликозиды. В высоких концентрациях эти стероиды являются ингибиторами  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, а в низких — модуляторами ее сигнальной функции. Эндогенные структурные аналоги этих соединений получили название эндогенные дигиталисоподобные факторы [13, 14]. Концентрация эндогенного оубаина в плазме крови человека колеблется в наномолярном диапазоне (от 0.6 до 1.2 нМ) [13, 15]. У пациентов с кардиологической и нефрологической патологией зарегистрировано повышение уровня эндогенных дигиталисоподобных факторов в плазме крови [16].

Чувствительность различных изоформ  $\alpha$ -субъединицы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы к кардиотоническим стероидам может различаться, но у грызунов это различие выражено в наибольшей степени. У этих животных  $\alpha_1$ -изоформа малочувствительна к оубаину (константа блокирования составляет десятки и сотни мкМ), напротив, изоформы  $\alpha_2$ - и  $\alpha_3$ -высокочувствительны к оубаину (константа блокирования составляет десятки и сотни нМ). У других млекопитающих, включая человека, чувствительность  $\alpha_1$ -изоформы к оубаину лежит в наномолярном диапазоне концентраций [17, 18]. Классическим объектом при изучении свойств сердечных гликозидов является куриный и утиный эмбрион [19]. Предполагается существование двух пулов  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, один из которых функционирует как ионный насос. Другой пул, преимущественно локализованный в кавеолах, образует молекулярный комплекс с EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) и Src-киназой [20–22] и участвует в мембранной и внутриклеточной сигнальной трансдукции [23]. Выявлен участок  $\alpha$ -субъединицы (так называемая NaKtide последовательность), отвечающий за реализацию сигнальной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и предположительно специфичный для  $\alpha_1$ -изоформы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в скелетной мышце [20]. В области концевой пластинки никотиновый холинорецептор колокализован с  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой, фосфолемманом и кавеолином-3 [24, 25]. В настоящее время

интенсивно изучается участие эндогенных оубаин-подобных соединений в механизмах регуляции, реализуемых через сигнальную функцию  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы [26].

Помимо регуляции ионного транспорта  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза в качестве трансдуктора сигнала участвует в модуляции клеточного метаболизма, стимулирует рост и пролиферацию клеток разных тканей. Продемонстрирована роль сигнальной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в регуляции роста ткани сердца [27, 28], сетчатки [29], сенсорных нейронов [30]. Вклад сигнальной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы и эндогенных дигиталисоподобных факторов в регуляцию трофических процессов скелетной мышцы не исследован.

Цель работы: оценка участия ацетилхолина и  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в регуляции роста скелетных мышц куриного эмбриона в условиях органотипического культивирования ткани.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

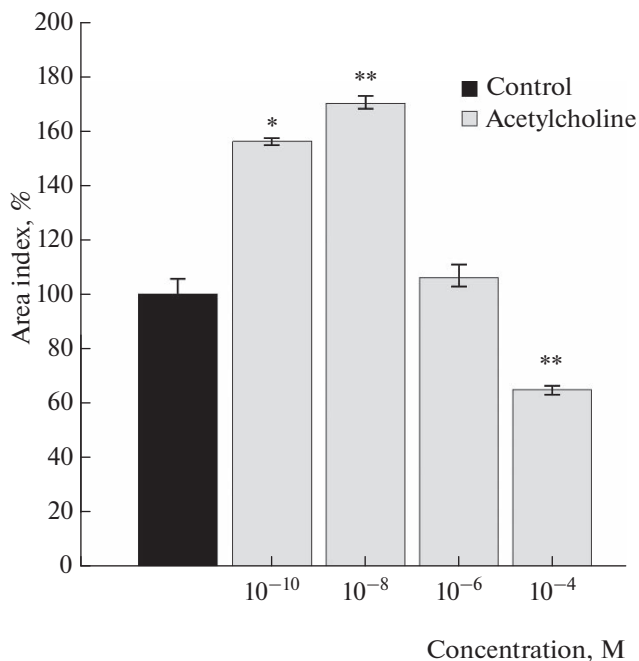
Объектами исследования являлись эксплантаты ткани скелетной мышцы голени 10–12-дневных куриных эмбрионов породы белый Леггорн. Каждая серия эксперимента включала 120 контрольных и 120 экспериментальных эксплантатов на каждую исследованную концентрацию действующих веществ. Фрагменты эмбриональной мышечной ткани размером 0.5–1 мм переносили в чашки Петри на коллагеновую подложку. Каждая чашка Петри содержала 20 эксплантатов ткани мышцы голени. Добавляли питательную среду, состоящую из раствора Хенкса (50 об. %) (Биолот, Россия), среды Игла (40 об. %) (Биолот, Россия), эмбриональной телячьей сыворотки (9.5 об. %) (Thermo Fisher Scientific, Бразилия), глюкозы 40% (0.5 об. %) (Производственная фармацевтическая компания Обновление, Россия) ципрофлоксацина (2 мг/мл) (Красфарма, Россия), и культивировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (Binder, Германия) при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$ . В питательную среду экспериментальных эксплантатов добавляли ацетилхолин (Sigma, США), оубаина октагидрат (Sigma, США) и d-тубокурарина гидрохлорид (Sigma, США) согласно протоколу эксперимента. Через трое суток культивирования чашки Петри извлекали из  $\text{CO}_2$ -инкубатора и исследовали с использованием морфометрии.

Влияние исследуемых веществ на рост эксплантатов мышечной ткани оценивали при помощи морфометрического критерия — индекс площади, который рассчитывали, как отношение площади всего эксплантата к площади центральной зоны. За условную единицу площади принимали квадрат окуляр-сетки микроскопа. Значение индекса площади контрольных эксплантатов принимали за 100%. Контрольными являлись эксплантаты, развивающиеся в условиях питательной среды стандартного состава.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 10.0. При сравнении контрольной и экспериментальной групп использовали *t*-критерий Стьюдента для двух независимых выборок. Множественные сравнения проводили с применением дисперсионного анализа ANOVA. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего, выраженные в %. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ацетилхолина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы исследовали в диапазоне концентраций от  $10^{-10}$  до  $10^{-4}$  М. Действие ацетилхолина было дозозависимым. Концентрации ацетилхолина  $10^{-10}$  и  $10^{-8}$  М проявили тропотропный эффект. Добавление в питательную среду ацетилхолина в концентрации  $10^{-10}$  М

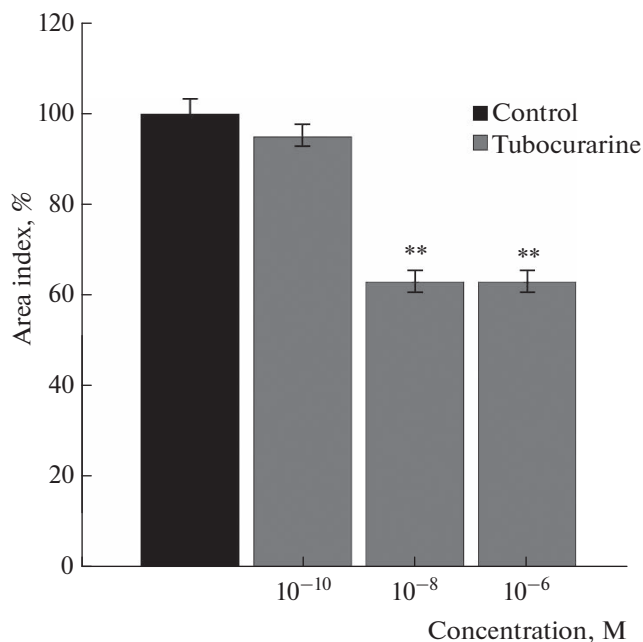


**Рис. 1.** Ацетилхолин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани скелетной мышцы. \* —  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$  по сравнению с контрольным значением.

стимулировало рост эксплантатов на  $56.0 \pm 1.8\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем. Максимальный трофотропный эффект ацетилхолин проявил в концентрации  $10^{-8}$  М: индекс площади экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на  $70.0 \pm 2.4\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.01$ ). В дозе  $10^{-6}$  М ацетилхолин не оказывал действия на рост исследуемой ткани. Ацетилхолин в концентрации  $10^{-4}$  М ингибировал рост мышечной ткани на  $35.0 \pm 1.2\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.01$ ) (рис. 1).

Для оценки вклада никотиновых холинорецепторов в обнаруженный нами трофотропный эффект ацетилхолина провели серию экспериментов с использованием d-тубокурарина гидрохлорида (рис. 2). В концентрациях  $10^{-8}$  и  $10^{-6}$  М препарат достоверно ингибировал рост эксплантатов ткани скелетной мышцы на  $37.0 \pm 3.3\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.01$ ) и  $37.0 \pm 4.0\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.01$ ) соответственно. В концентрации  $10^{-10}$  М d-тубокурарин не влиял на рост экспериментальных эксплантатов. Поэтому для культивирования эксплантатов ткани скелетной мышце в питательной среде, содержащей ацетилхолин и d-тубокурарин, была выбрана концентрация блокатора  $10^{-10}$  М. При культивировании экспериментальных эксплантатов в среде, содержащей блокатор никотиновых холинорецепторов d-тубокурарин ( $10^{-10}$  М) и ацетилхолин ( $10^{-8}$  М), трофотропный эффект ацетилхолина отсутствовал.

Участие  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в регуляции роста эксплантатов ткани скелетной мышцы в аналогичных условиях было исследовано в следующей экспериментальной серии. Влияние оубаина на рост экспериментальных эксплантатов оценивали в диапазоне концентраций от  $10^{-10}$  до  $10^{-4}$  М. В концентрации  $10^{-4}$  и  $10^{-6}$  М оубаин проявил миотоксический эффект, индекс площади экспериментальных экс-

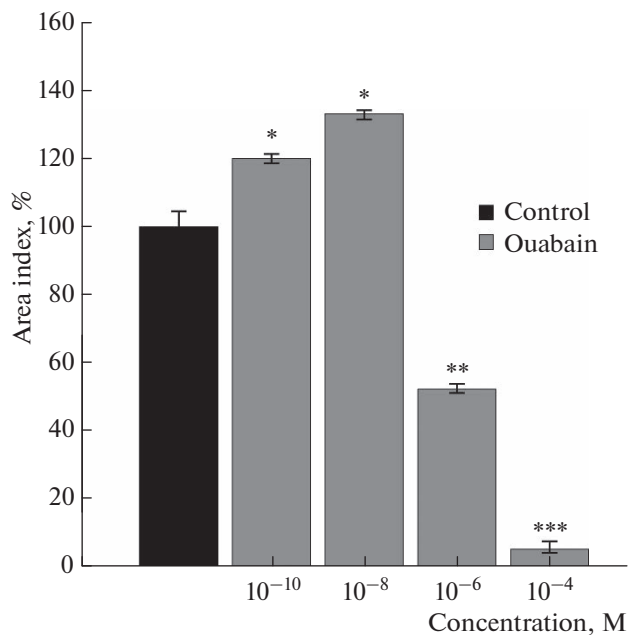


**Рис. 2.** Влияние тубокураина на рост эксплантатов ткани скелетной мышцы. \*\* —  $p < 0.01$  по сравнению с контрольным значением.

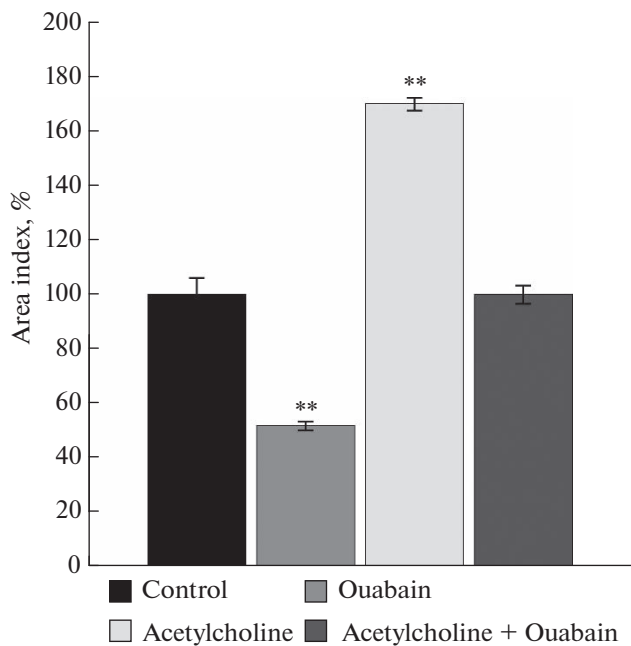
плантатов был на  $95.0 \pm 2.0\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.001$ ) и  $48.0 \pm 1.4\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.01$ ) ниже контрольного значения. Максимальный трофотропный эффект препарат обнаружил в концентрации  $10^{-8}$  М, индекс площади экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения на  $33.0 \pm 1.3\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 3). В концентрации  $10^{-10}$  М оубаин стимулировал рост на  $20.0 \pm 1.5\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.05$ ).

Для того чтобы оценить возможность регуляции сигнальной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы ацетилхолином в концентрации, сопоставимой с той, что достигается при некантовом выделении, были поставлены отдельные серии экспериментов. Эксплантаты ткани скелетной мышцы культивировали в питательной среде, содержащей совместно ацетилхолин  $10^{-8}$  М и оубаин  $10^{-6}$  М. Оказалось, что ацетилхолин нивелирует миотоксический эффект оубаина. Индекс площади экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения (рис. 4).

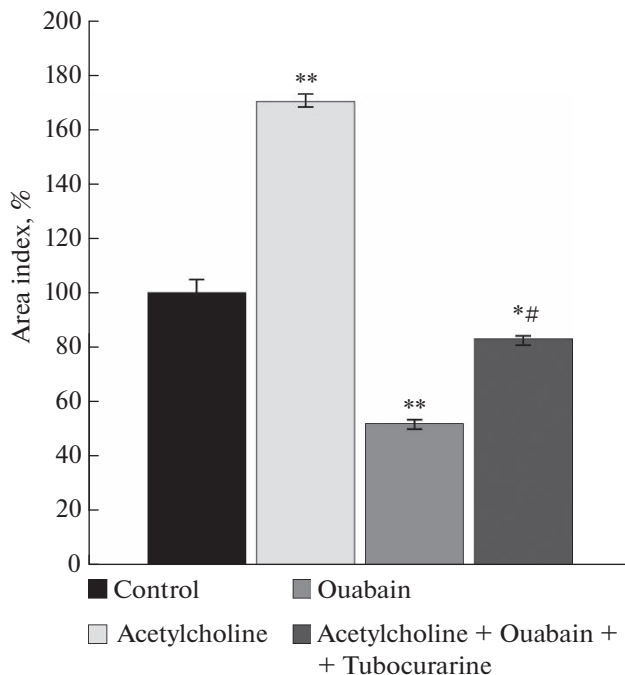
Для того чтобы исключить участие никотиновых холинорецепторов в обнаруженном нами эффекте, экспериментальные эксплантаты культивировали в питательной среде, содержащей ацетилхолин ( $10^{-8}$  М), оубаин ( $10^{-6}$  М) и d-тубокурарин ( $10^{-10}$  М). В присутствии d-тубокураина ацетилхолин устранял миотоксический эффект оубаина ( $10^{-6}$  М) не полностью. Индекс площади эксплантатов был ниже контрольного значения на  $17.0 \pm 1.0\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.05$ ) и отличался от индекса площади эксплантатов, культивируемых в присутствии только оубаина на  $31.0 \pm 1.1\%$  ( $n = 120$ ,  $p < 0.001$ ) (рис. 5). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ацетилхолин устраняет ингибирующее рост эксплантатов скелетной ткани действие оубаина как прямо, действуя на  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазу, так и рецептор-опосредовано через никотиновый холинорецептор.



**Рис. 3.** Оуабаин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани скелетной мышцы. \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  по сравнению с контрольным значением.



**Рис. 4.** Ацетилхолин в концентрации, сопоставимой с неквантовым выходом ( $10^{-8}$  М), нивелирует миотоксический эффект оуабаина ( $10^{-6}$  М). \*\* –  $p < 0.01$  по сравнению с контрольным значением.



**Рис. 5.** Вклад никотинового холинорецептора в модуляцию сигнальной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы ацетилхолином в концентрации  $10^{-8}$  М. \* —  $p < 0.05$ , \*\* —  $p < 0.01$  по сравнению с контрольным значением. # —  $p < 0.001$  по сравнению с индексом площади эксплантатов, культивируемых в присутствии ацетилхолина и оубаина.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Физиологическое значение низких концентраций ацетилхолина связывают с поддержанием мембранного потенциала покоя, характерного для иннервированной мышцы [31]. Кроме того, было показано, что неквантовое выделение ацетилхолина из двигательных нервных окончаний в начале иннервационного процесса является обязательным условием перехода от полинейронального характера иннервации к мононейрональному [32]. Описана также шунтирующая роль неквантового ацетилхолина, при которой его выделение из нервного окончания в состоянии покоя препятствует аллостерическому ингибированию фермента, синтезирующего медиатор избытком продукта [31]. Нам удалось показать, что ацетилхолин дозозависимо влияет на рост эксплантатов скелетной мышцы. Максимальный миостимулирующий эффект ацетилхолин проявил в концентрации  $10^{-8}$  М. При культивировании эксплантатов ткани скелетной мышцы в питательной среде, содержащей ацетилхолин ( $10^{-8}$  М) и d-тубокурарин в концентрации  $10^{-10}$  М трофотропный эффект ацетилхолина отсутствовал, что свидетельствует о вовлеченности никотиновых холинорецепторов в реализацию трофотропного действия препарата. В условиях органотипического культивирования ткани сердца было обнаружено аналогичное действие ацетилхолина. Также ацетилхолин в концентрации  $10^{-8}$  М устранял кардиотоксическое действие оубаина  $10^{-8}$  М [33].

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза участвует в регуляции клеточного роста и пролиферации во многих тканях организма [27–30]. Рядом авторов описана роль  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в регуляции метаболизма скелетной мышцы. В опытах на скелетных мышечных клетках человека показана возможность Src-зависимой регуляции синтеза гликогена наномолярными концентрациями оуабаина [34], обсуждается также участие Src-киназы в реализации сигнальной функции оуабаин-чувствительной  $\alpha_1$ -изоформы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в мышцах [35]. Участие  $\alpha_2$ - и  $\alpha_3$ -изоформ  $\alpha$ -субъединицы в сигнальной трансдукции в ткани скелетной мышцы подвергается сомнению [20, 21]. Необходимо отметить, что в скелетной мышце куриного эмбриона зарегистрирована экспрессия  $\alpha_1$ -изоформы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы [36]. Результаты других исследований демонстрируют, что функционирование скелетных мышц необходимо для поддержания насосной функции  $\alpha_2$ -изоформы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, а изменению ее активности, в свою очередь, предшествует атрофия мышц, индуцированная краткосрочной функциональной разгрузкой камбаловидной мышцы [37].

В ходе работы обнаружено трофотропное действие оуабаина в концентрациях, сопоставимых с эндогенными ( $10^{-8}$  и  $10^{-10}$  М). В высоких дозах ( $10^{-6}$  и  $10^{-4}$  М) оуабаин ингибирует рост эксплантатов скелетных мышц на 48 и 95% соответственно. Полученные результаты сочетаются с данными, обнаруженными Oliveira с соавт. при изучении роли  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в миогенезе куриных эмбрионов [36]. Оказалось, что оуабаин в концентрации  $10^{-5}$  М ингибирует рост клеток мышечной ткани на 45%, а также уменьшает образование многоядерных миотрубочек. Ингибитор MEK–ERK сигнальных путей U0126 не влиял на выживаемость клеток и не устранял миотоксическое действие оуабаина. Ингибирующий эффект оуабаина также сохранялся на фоне блокатора р38 SB202190. Таким образом, ингибирующий эффект  $10^{-5}$  М оуабаина не связан с сигнальной функцией фермента, а опосредован блокированием насосной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы. Авторы не обнаружили изменений в количестве одноядерных клеток, количестве ядер внутри мышечных трубочек и общего количества ядер при действии  $10^{-6}$  М оуабаина, хотя количество мышечных трубочек уменьшилось. Интересно отметить, что в отличие от оуабаина в дозе  $10^{-5}$  М 24-часовая инкубация клеток в питательной среде, содержащей оуабаин  $10^{-6}$  М и блокатор р38, приводила к увеличению числа миотрубочек и одноядерных клеток, хотя общее количество ядер и количество ядер в миотрубочках не изменялось. Дозозависимый эффект оуабаина может быть опосредован различием в механизме действия [36].

$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза может образовывать ансамбли с рецепторами и ионными каналами [38]. Одними из первых были выявлены структурно-функциональные взаимодействия между  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазой и никотиновым холинорецептором. Исследования под руководством И.И. Кривого показали, что ацетилхолин в концентрации 100 нМ вызывает гиперполяризацию постсинаптической мембраны на 4 мВ. Этот эффект наблюдался в присутствии ингибитора ацетилхолинэстеразы — армина и негидролизуемых агонистов Н-холинорецепторов: карбамилхолина и никотина. Введение специфических агонистов d-тубокурарина и бунгаротоксина устраняло ацетилхолин-вызванную гиперполяризацию. Введение проадифена, который не связывается с сайтом связывания ацетилхолина, а блокирует натриевый ток через канал, не влияло на ацетилхолин-вызванную гиперполяризацию мышечной мембраны. Выявленная зависимость ацетилхолин-вызванной гиперполяризации от концентрации ацетилхолина позволила предположить, что эффект обусловлен связыванием ацетилхолина со специфическим сайтом связывания рецептора, а не с каким-либо другим белком. Оуабаин ингибировал ацетилхолин-вызванную

гиперполяризацию в наномолярном диапазоне, что указывает на участие именно  $\alpha_2$ -изоформы  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в модуляции электрогенеза постсинаптической мембраны [22]. Также доказано, что ацетилхолин не влияет на активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, если она не представлена в едином комплексе с никотиновым холинорецептором [4]. Предполагают, что физиологическая роль данной гиперполяризации заключается в тонкой настройке мембранного электрогенеза, а, следовательно, более эффективной нервно-мышечной передаче возбуждения.

Для установления возможности прямой активации  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы ацетилхолином было проведено исследование электрогенной активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы при действии ацетилхолина в ткани почки ягненка и эритроцитах — системах, где отсутствует никотиновый холинорецептор. Изменение активности фермента не обнаружено [11]. Однако в этом исследовании оценивали только насосную функцию  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, запуск сигнальных каскадов, опосредуемый активацией сигнальной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, не изучался. Обнаруженное нами нивелирование миотоксического эффекта оубаина ацетилхолином на фоне блокады никотинового холинорецептора d-тубокурарином указывает на возможность прямой регуляции сигнальной функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы ацетилхолином. Что касается внутриклеточных процессов, запускаемых ацетилхолином, механизмы, лежащие в основе зарегистрированного нами эффекта, требуют дальнейшего изучения.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комитета по биоэтике Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследований и подготовку материалов статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Malomouzh AI, Nikolsky EE* (2018) Modern concepts of cholinergic neurotransmission at the motor synapse. *Biochemistry (Moscow) Suppl Series A Membrane and Cell Biology* 12 (3): 209–222.  
<https://doi.org/10.1134/S1990747818030078>
2. *Mitchell JF, Silver A* (1963) The spontaneous release of acetylcholine from the denervated hemidiaphragm of the rat. *J Physiol* 165(1): 117–129.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1963.sp007046>
3. *Kubasov IV, Krivoi II, Lopatina E V* (1994) Effect of exogenous acetylcholine on neuromuscular transmission in the stimulated rat diaphragm. *Bull Exp Biol Med* 118(5): 1153–1155.  
<https://doi.org/10.1007/BF02444610>

4. Кривой ИИ, Кубасов ИВ, Лопатина ЕВ (1994) Исследование восстановления работоспособности утомляемой диафрагмы крысы после применения экзогенного ацетилхолина. Физиол журн им ИМ Сеченова. 80(9): 61–66. [Krivoi II, Kubasov IV, Lopatina EV (1994) A study of recovery of working ability of the fatigued rat diaphragm after application of exogenous acetylcholine. *Physiol J IM Sechenov* 80(9): 61–66. (In Russ)].
5. Кубасов ИВ, Кривой ИИ, Лопатина ЕВ (1994) Исследование влияния экзогенного ацетилхолина на эффективность нервно-мышечной передачи в утомляемой диафрагме крысы. Бюл экспер биол мед 118(11): 457–459. [Kubasov IV, Krivoi II, Lopatina EV (1994) Investigation of the effect of exogenous acetylcholine on the effectiveness of neuromuscular transmission in the fatigued rat diaphragm *Bull eksp biol med* 118(11): 457–459. (In Russ)].
6. Kubasov IV, Krivoi II, Lopatina EV (1997) The role of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in the presynaptic aftereffect of exogenous acetylcholine in the rat diaphragm. *Bull Exp Biol Med* 123(5): 531–534. <https://doi.org/10.1007/BF02445319>
7. Krivoi II, Kravtsova VV, Lopatina EV (2000) Hyperpolarizing effect of acetylcholine in the skeletal muscle with different types of muscle fibers. *J Evol Biochem Physiol* 36(4): 491–494. <https://doi.org/10.1007/BF02737001>
8. Кривой ИИ, Лопатина ЕВ, Кравцова ВВ (2001) Роль  $\text{K}^+$ -каналов и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в гиперполяризации мембраны скелетных мышечных волокон, вызываемой ацетилхолином. Биол мембр 18(21): 10–15. [Krivoi II, Lopatina EV, Kravtsova VV (2001) Role of  $\text{K}^+$  channels and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in acetylcholine-induced hyperpolarization of skeletal muscle fibres. *Biol Membr* 18(1): 10–15. (In Russ)].
9. Nikolsky EE, Zemková H, Voronin VA, Vyskocil F (1994) Role of non-quantal acetylcholine release in surplus polarization of mouse diaphragm fibres at the endplate zone. *J Physiol* 477 (Pt 3): 497–502. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020210>
10. Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH (1991) Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14): 6259–6263. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.14.6259>
11. Blaustein MP, Hamlyn JM (2020) Ouabain, Endogenous Ouabain and Ouabain-like Factors: The  $\text{Na}^+$  Pump/Ouabain Receptor, its linkage to NCX, and its Myriad Functions. *Cell Calcium* 86: 102159. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102159>
12. Schoner W, Scheiner-Bobis G (2007) Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. *Am J Cardiovasc Drugs* 7(3): 173–189. <https://doi.org/10.2165/00129784-200707030-00004>
13. Akera TT, Brody M (1976) Inotropic action of digitalis and ion transport. *Life Sci* 18(2): 135–144. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(76\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(76)90017-5)
14. Dobretsov M, Stimers JR (2005) Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Front Biosci* 10: 2373–2396. <https://doi.org/10.2741/1704>
15. Cherniavsky LM, Karlsh SJ, Garty H (2015) Cardiac glycosides induced toxicity in human cells expressing  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -, or  $\alpha 3$ -isoforms of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* 309(2): 126–135. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00089.2015>
16. Лазарев НВ (ред) (1961) Руководство по фармакологии. В 2 т. М. Медгиз. [Lazarev NV (red) (1961) Manual of Pharmacology. In 2 V. M. Medgiz. (In Russ)].
17. Cui X, Xie Z (2017) Protein Interaction and Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction. *Molecules* 22(6): 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules22060990>
18. Yu H, Cui X, Zhang J, Xie JX, Banerjee M, Pierre SV, Xie Z (2018) Heterogeneity of signal transduction by Na-K-ATPase alpha-isoforms: role of Src interaction. *Am J Physiol Cell Physiol* 314(2): 202–210. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00124.2017>
19. Li Z, Cai T, Tian J, Xie J, Zhao X, Liu L, Shapiro JJ, Xie Z (2009) NaKtide, a Na/K-ATPase-derived peptide Src inhibitor, antagonizes ouabain-activated signal transduction in cultured cells. *J Biol Chem* 284(31): 21066–21076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.013821>
20. Wang Y, Ye Q, Liu C, Xie JX, Yan Y, Lai F, Duan Q, Li X, Tian J, Xie Z (2014) Involvement of Na/K-ATPase in hydrogen peroxide-induced activation of the Src/ERK pathway in LLC-PK1 cells. *Free Rad Biol Med* 71(31): 415–426. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.036>
21. Heiny JA, Kravtsova VV, Mandel F, Radzyukevich TL, Benziane B, Prokofiev AV, Pedersen SE, Chibalin AV, Krivoi II (2010) The nicotinic acetylcholine receptor and the Na,K-ATPase  $\alpha 2$  isoform

- interact to regulate membrane electrogenesis in skeletal muscle. *J Biol Chem* 285: 28614–28626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.150961>
22. Chibalin AV, Heiny JA, Benziane B, Prokofiev AV, Vasiliev AN, Kravtsova VV, Krivoi II (2012) Chronic nicotine exposure modifies skeletal muscle  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase activity through its interaction with the nicotinic acetylcholine receptor and phospholemman. *PLoS One* 7: e33719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033719>
23. Xie Z., Xie J (2015) The  $\text{Na}/\text{K}$ -ATPase-mediated signal transduction as a target for new drug development. *Front Biosci* 10: 3100–3109. <https://doi.org/10.2741/1766>
24. Nikolsky EE, Oranska TI, Vyskocil F (1996) Nonquantal acetylcholine release in the mouse diaphragm after phrenic nerve crush and during recovery. *Exp Physiol* 81(3): 341–348. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1996.sp003938>
25. Krivoi II, Drabkina TM, Kravtsova VV, Vasiliev AN, Eaton MJ, Skatchkov SN, Mandel F (2006) On the functional interaction between nicotinic acetylcholine receptor and  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. *Pflug Arch Eur J Physiol* 452(6): 756–765. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0081-6>
26. Cisterna BA, Vargas AA, Puebla C (2020) Active acetylcholine receptors prevent the atrophy of skeletal muscles and favor reinnervation. *Nat Commun* 11(1): 1073. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14063-8>
27. Xie Z, Askari A (2002)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase as a signal transducer *Eur J Biochem* 269: 2434–2439. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02910.x>
28. Lopatina EV, Kipenko AV, Pasatetskaya N, Penniyaynen VA, Krylov BV (2016) Modulation of the transducer function of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase: new mechanism of heart remodeling. *Canad J Physiol Pharmacol* 94(10): 1110–1116. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0577>
29. Lopatina EV, Karetsky AV, Penniyaynen VA, Vinogradova TV (2008) Role of cardiac glycosides in regulation of the growth of retinal tissue explants. *Bull Exp Biol Med* 146(12): 651–653. <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0384-7>
30. Pennijajnen VA, Lopatina EV (2005) Role of  $\text{Na}/\text{K}$ -ATPase in regulation of neurite growth in sensory neurons. *Bull Exp Biol Med* 139(2): 190–192. <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0244-z>
31. Маломуж АИ, Никольский ЕЕ (2010) Неквантовое освобождение медиатора: миф или реальность? Успехи физиол наук 41(2): 27–43. [Malomouzh AI, Nikolsky EE (2010) Non-quantal mediator release: myth or reality? *Uspekhi Fiziol Nauk* 41(2): 27–43. (In Russ)].
32. Vyskocil F, Vrbova G (1993) Non-quantal release of acetylcholine affects polyneuronal innervation on developing rat muscle fibres. *Eur J Neurosci* 5: 1677–1683. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00235.x>
33. Lopatina EV, Pennijajnen VA, Zajka AA (2005) Regulatory Role of  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase in the Growth of Heart Tissue Explants in Organotypic Culture. *Bull Exp Biol Med* 140(8): 150–153. <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0440-x>
34. Kotova O, Al-Khalili L, Talia S, Hooke C, Fedorova OV, Bagrov AY, Chibalin AV (2006) Cardio-tonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a Src- and ERK1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281(29): 20085–20094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601577200>
35. Pirkmajer S, Bezjak K, Matkovic U, Dolinar K, Jiang LQ, Mis K, Gros K, Milovanova K, Pirkmajer KP, Mars T, Kapilevich L, Chibalin AV (2020) Ouabain Suppresses IL-6/STAT3 Signaling and Promotes Cytokine Secretion in Cultured Skeletal Muscle Cells. *Front Physiol* 11: 1–50. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.566584>
36. Oliveira TN, Possidonio AC, Soares CP, Ayres R, Costa ML, Quintas LE, Mermelstein C (2015) The role of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase during chick skeletal myogenesis. *PLoS One* 10(3): e0120940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120940>
37. Kravtsova VV, Matchkov VV, Bouzinova EV, Vasiliev AN, Razgovorova IA, Heiny JA, Krivoi II (2015) Isoform-specific  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase alterations precede disuse-induced atrophy of rat soleus muscle. *Bio Med Res Int* 2015: 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/720172>
38. Лопатина ЕВ, Поляков ЮИ (2011) Синтетический анагетик аноцептин: результаты до-клинических и клинических исследований. Эфферентная терапия 17(3): 79–81. [Lopatina EV, Poljakov JuI (2011) Synthetic analgesic anocetpin: results of preclinical and clinical studies]. *Jefferent Terapija* 17(3): 79–81. (In Russ)].

## The Involvement of Acetylcholine and $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in the Regulation of Skeletal Muscle Growth

E. V. Lopatina<sup>a, b, \*</sup>, A. V. Gavrichenko<sup>a</sup>, and N. A. Pasatetskaya<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

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

\*e-mail: evlopatina@yandex.ru

Recently, more and more attention has been paid to the discussion of the trophic function of the nervous system and its participation in the launch of signaling cascades regulating cellular metabolism. The role of acetylcholine and  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in the regulation of skeletal muscle growth in 10–12-day-old chicken embryos under conditions of organotypic tissue culture was evaluated. The maximum trophotropic effect of acetylcholine was shown in a concentration  $10^{-8}$  M. Inhibitory analysis proved the participation of the nicotinic acetylcholine receptor in this effect. Ouabain dose-dependent regulated the growth of skeletal muscle tissue explants. In concentrations comparable to endogenous ones, the glycoside stimulated the growth of experimental explants by 33% compared to the control value. The myotoxic properties of ouabain were found in the concentration range  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M. Acetylcholine eliminated the myotoxic effect of the ouabain ( $10^{-6}$  M) both directly acting on the  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, and the receptor-mediated through the nicotinic acetylcholine receptor.

**Keywords:** organotypic tissue culture, skeletal muscle, acetylcholine, nicotinic acetylcholine receptor,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, ouabain

---

---

МЕТОДИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

---

---

**МЕЖПОЛУШАРНАЯ СИММЕТРИЯ И АСИММЕТРИЯ ПИК-ВОЛНОВЫХ  
РАЗРЯДОВ АБСАНСНОГО ТИПА, ВЫЗВАННЫХ СИСТЕМНЫМ  
ВВЕДЕНИЕМ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛА**

© 2023 г. А. С. Ершова<sup>1</sup>, Е. М. Сулейманова<sup>2</sup>, А. А. Грищенко<sup>1, \*</sup>,  
Л. В. Виноградова<sup>2</sup>, И. В. Сысоев<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>*Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия*

<sup>2</sup>*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

*\*E-mail: vili\_von@mail.ru*

Поступила в редакцию 21.11.2022 г.

После доработки 27.12.2022 г.

Принята к публикации 28.12.2022 г.

Абсансная эпилепсия — специфическая генерализованная неконвульсивная форма эпилепсии, чаще всего встречающаяся у детей и подростков. Традиционно считается, что возникающие пик-волновые разряды являются полностью генерализованными в коре обоих полушарий, что наблюдается у людей на поверхностных электроэнцефалограммах и магнитоэнцефалограммах. Однако основное изучение механизмов этой формы эпилепсии проводится на животных, главным образом на крысах, — генетических и фармакологических моделях, поскольку необходимо измерение сигналов не только из коры, но и подкорковых структур мозга (например, таламуса, участвующего в генерации пик-волновых разрядов), что невозможно сделать на людях, у которых нет медицинских показаний для внутричерепных измерений. У животных с абсансной эпилепсией локальные потенциалы почти всегда регистрируются из одного полушария, чтобы охватить максимальное число задействованных структур мозга. При этом степень одновременности появления и прекращения абсансных пик-волновых разрядов в разных полушариях у животных практически не исследована, а сама разметка в подавляющем большинстве случаев делается на основе одного канала моторной или соматосенсорной коры. Цель данной работы — выявить различия и сходство статистических характеристик пик-волновых разрядов в двух полушариях коры на модели фармакологически вызванных судорог абсансного типа. Пик-волновые разряды являются основным энцефалографическим маркером абсансов у крыс, подвергнутых воздействию пентилентетразола. Для детектирования разрядов в работе предложен метод их автоматической разметки, оценены его чувствительность и специфичность на примере записей девяти животных. С помощью данного метода произведена разметка приступов в симметричных отведениях коры из обоих полушарий по отдельности. По результатам анализа длительности приступов оказалось, что для пяти из девяти животных распределение разрядов значимо различается между полушариями, а для других четырех — нет. Следовательно, у крыс-моделей пик-волновая активность может быть генерализована как симметрично, так и несимметрично, что может быть обусловлено индивидуальными особенностями или различными сценариями запуска разрядов.

*Ключевые слова:* эпилепсия, пентилентетразол, асимметрия, автоматическое обнаружение приступов, ЭЭГ, животные-модели эпилепсии

**DOI:** 10.31857/S0869813923020048, **EDN:** NDLJNT

## ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия — хроническое заболевание головного мозга, которое часто сопутствует или провоцирует другие расстройства высшей нервной деятельности, в том числе волну распространяющейся депрессии. Абсансная эпилепсия чаще всего встречается среди детей и подростков, характеризуется потерей сознания на короткое время, иногда она имеет постепенное начало и окончание. У больных абсансной эпилепсией нет показаний для инвазивных исследований и хирургического вмешательства, что затрудняет получение информации о механизмах этого заболевания. Поэтому традиционно экспериментальную работу проводят на животных, у которых возможно производить хирургические вмешательства и записывать сигналы глубоких структур мозга. Самыми популярными в настоящее время являются крысы с генетической предрасположенностью к заболеванию линий WAG/Rij [1] и GAERS [2]. Для этих животных, начиная с некоторого возраста, характерны спонтанные пик-волновые разряды, средняя частота которых составляет 8–9 Гц у крыс WAG/Rij и 5–6 Гц у крыс GAERS [3], а медианная длительность разрядов — около 6 с [4].

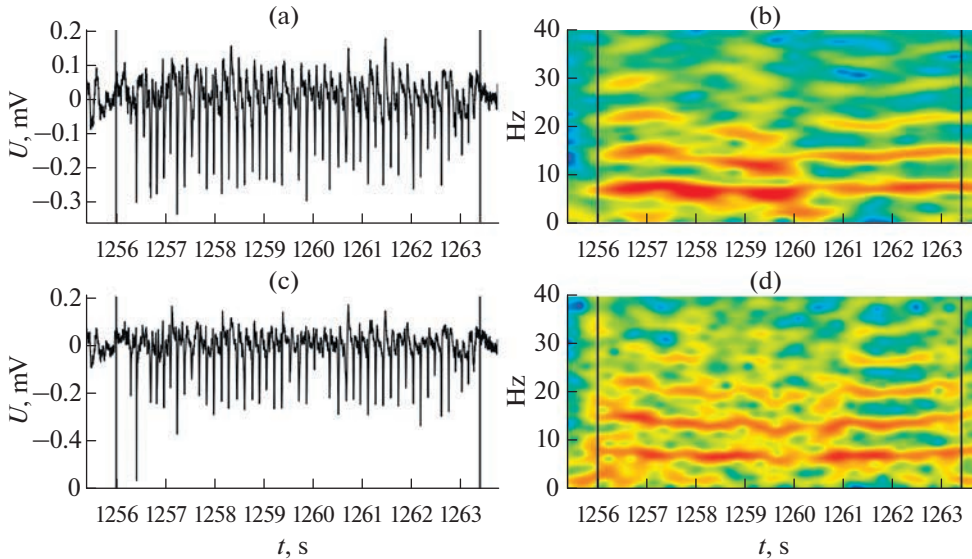
Кроме того, исследования проводятся и на фармакологических моделях, которые хороши тем, что позволяют моделировать вызванные судороги абсансного типа у исходно здоровых животных путем однократной интенсивной стимуляции. Наиболее популярными моделями этого типа являются животные, пик-волновые разряды у которых вызваны введением низких доз пентилентетразола (ПТЗ), см. обзор [5]: крысы [6], мыши [7] и морские свинки [8]. При этом более высокие дозы того же вещества вызывают тонико-клонические судороги [9, 10]. Для нас эти модели имеют большое значение в том числе потому, что различные дозы и протоколы введения ПТЗ могут приводить как к эпилептическим приступам, так и к появлению волны распространяющейся депрессии [11–13].

Традиционно принято считать, что у крыс с индуцированными ПТЗ абсансами [12], как и у животных с генетической абсансной эпилепсией [1], а также и у пациентов [14], разряды в коре правого и левого полушарий головного мозга одинаковы. Поэтому, чтобы охватить как можно больше структур мозга, в той или иной степени вовлеченных в пик-волновую активность, все электроды ставят в одно полушарие. Тем не менее, вопрос о том, являются ли такие разряды действительно всегда первично генерализованными в обоих полушариях, систематически не исследовался. Известно, что при других формах эпилепсии, изначально фокальных, волна распространяющейся депрессии возникает только в одном полушарии [15], между тем ПТЗ в больших дозах также вызывает и тонико-клонические приступы, свойственные лимбической и аудиогенной вторично генерализованной эпилепсии, и волну распространяющейся депрессии. Поэтому потенциально можно ожидать, что асимметрия в распространении абсансов, вызванных системным введением ПТЗ, возможна.

Цель данной работы — по временным рядам локальных потенциалов коры двух полушарий проверить симметричность абсансов, вызванных системным введением ПТЗ.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на самцах крыс линии Wistar, в возрасте 6–7 мес., полученных из питомника “Столбовая” (Московская область). Электрическая активность неокортекса регистрировалась с помощью электродов (стальных винтов), имплантированных в симметричные области фронтальной коры обоих полушарий по координатам: AP 2; ML  $\pm$  2; DV 1 [16]. В качестве индифферентного электрода использовали стальной винт, расположенный над мозжечком. Электроды вживля-



**Рис. 1.** Временные ряды (а, с) и спектрограммы (b, d) пик-волнового разряда, записанного в лобной коре правого (а, b) и левого (с, d) полушарий крысы № 8. Оси  $X$  — время в с ( $t$ , s), оси  $Y$  — напряжение ( $U$ , mV) на временных рядах или частота в герцах ( $f$ , Hz) на спектрограммах. На всех графиках черные вертикальные линии означают начало и конец разряда.

лись под наркозом (хлоралгидрат, 380 мг/кг) за две недели до начала экспериментов. Электрическую активность коры регистрировали с помощью 4-канального усилителя и АЦП (E14-440, L-Card, Россия) у бодрствующих свободно подвижных животных. Для индукции пик-волновых разрядов использовалось внутривенное введение конвульсанта ПТЗ в дозе 40 мг/кг. По окончании эксперимента проводили гистологический анализ для определения локализации регистрирующих электродов. В данной работе рассматривались записи 9 животных, длительность всех записей составляла не менее 1 ч, в среднем около 90 мин. Типичный разряд представлен на рис. 1. Из спектрограмм (см. рис. 1b, d) видно, что колебания во время разряда очень нелинейные: можно надежно различить пять гармоник основной частоты.

Непосредственно регистрируемые (необработанные) ряды не подходят для анализа из-за наличия трендов и помех. Поэтому, во-первых, с помощью извлечения скользящего среднего, рассчитанного на временном интервале 2 с, удалялся медленный тренд, обусловленный особенностями процедуры измерения. Затем сигнал дополнительно фильтровался: режекторным фильтром в полосе 49–51 Гц удалялась сетевая 50 Гц наводка, фильтром высоких частот — все частотные компоненты на частотах более 99 Гц: эти компоненты не принимают существенного участия в пик-волновых разрядах. При этом в сигнале сохранялись высокоамплитудные артефакты (движения, компенсации и т.д.), поскольку записи были достаточно длинными и проводились у свободно подвижных животных.

Чтобы быстро и непредвзято проверить гипотезу о симметричном распространении патологической активности, необходимо выделить разряды из фоновой активности и определить длительность разрядов с помощью автоматического метода. Мы использовали очень простой подход, частично основанный на ранее предложенных подходах [17, 18], но без использования спектральных свойств сигнала, так

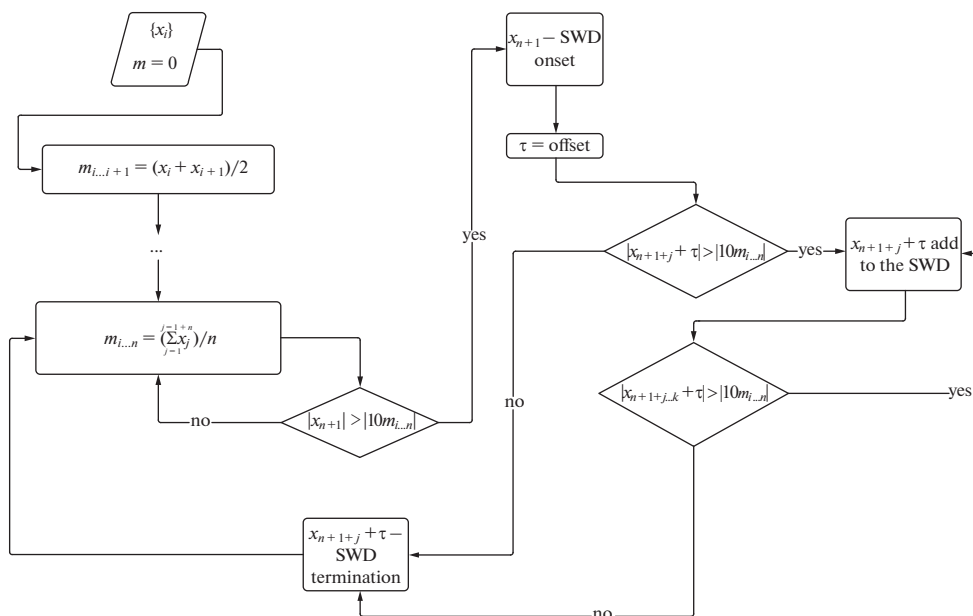


Рис. 2. Блок-схема разработанного алгоритма для определения пик-волнового разряда.

как у рассматриваемой фармакологической модели основная частота не так стабильна, как у крыс WAG/Rij, у которых основной временной масштаб сохраняется не только в течение всего разряда, но и возникает до него [19]. Поскольку мы искали пик-волновые комплексы, предложенный подход основан на обнаружении пиков и состоит в следующем.

Пусть имеется временной ряд значений  $\{x_i\}$  — скалярная запись локальных потенциалов поля, где  $i$  — номер момента времени. Среднее  $m_i$  рассчитывается для значений в ряде, предшествующих  $x_{i+1}$  и расположенных после последнего обнаруженного разряда (либо с начала записи). Затем каждое  $(x_{i+1})$  сравнивается с  $(10|m_i|)$ , где константа 10 подобрана эмпирически и является параметром метода. Если  $|x_{i+1}| > 10|m_i|$ , считается, что  $x_{i+1}$  является началом пик-волнового комплекса. Если два пика находятся рядом и их разделяет не более  $\tau$  значений, где  $\tau$  определяется на основании спектральных свойств сигнала: основной период пик-волновой активности для данной модели абсансов составляет 6 Гц, то все значения между ними считаются частью пик-волнового разряда. Блок-схема алгоритма разряда изображена на рис. 2.

Для проверки точности метода были рассчитаны специфичность и чувствительность. Чувствительность означает способность метода обнаруживать разряды, которые действительно присутствовали, и рассчитывается как  $N_{\text{tf}}/N_{\text{real}}$ , где  $N_{\text{tf}}$  — количество реальных пиков-волновых комплексов, найденных алгоритмом, а  $N_{\text{real}}$  — полное количество истинных пиков-волновых комплексов по разметке энцефалографа. Специфичность — это способность метода избегать ложноположительных результатов. Хорошая специфичность означает относительно небольшое количество ложно выявленных разрядов. Специфичность рассчитывается как  $1 - N_{\text{ff}}/N_{\text{real}}$ , где  $N_{\text{ff}}$  — число ложноположительных обнаружений. Результаты оценки специфичности приведены в табл. 1 и чувствительности в табл. 2.

**Таблица 1.** Таблица специфичности

| Номер крысы | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | Среднее      |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| Левая кора  | 84.99 | 95.45 | 92.31 | 84.47 | 84.44 | 98.28 | 88.75 | 71.64 | 86.57 | 87.43 ± 7.31 |
| Правая кора | 85.06 | 100   | 93.33 | 82.83 | 74.49 | 92.31 | 87.82 | 71.01 | 84.50 | 85.71 ± 8.58 |

Таблица показывает количественные значения специфичности в процентах.

**Таблица 2.** Таблица чувствительности

| Номер крысы | 1    | 2    | 3    | 4  | 5  | 6    | 7  | 8  | 9  | Среднее       |
|-------------|------|------|------|----|----|------|----|----|----|---------------|
| Левая кора  | 91.6 | 43.1 | 97.8 | 98 | 92 | 64.4 | 95 | 96 | 99 | 86.32 ± 18.28 |
| Правая кора | 87.8 | 40   | 95.8 | 98 | 90 | 9.06 | 93 | 98 | 89 | 77.85 ± 29.62 |

Таблица показывает количественные значения чувствительности в процентах.

Видно, что результаты отличаются для разных животных. В основном, при лучшей чувствительности мы получаем худшую специфичность и наоборот, что очень естественно и типично [18]. Однако среднего значения чувствительности и специфичности вполне достаточно, чтобы использовать метод для автоматического определения, если мы хотим получить общее впечатление и сравнить результаты по левому и правому полушариям.

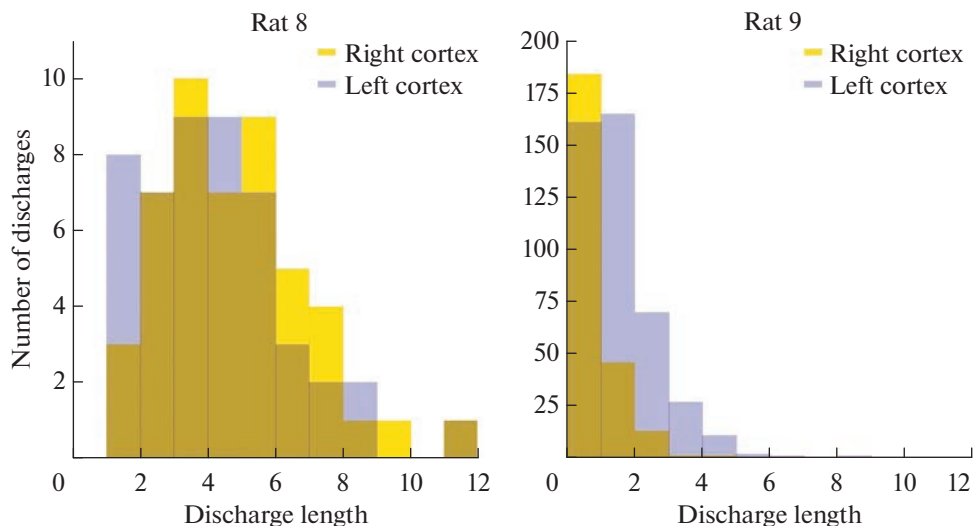
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поскольку метод показал достаточную чувствительность и специфичность, для анализа использовалась длительность разрядов, полученная с помощью предложенного алгоритма автоматического детектирования. По результатам обнаружения были построены гистограммы длительности разрядов для каждого животного отдельно. Для примера, гистограммы для животных № 8 и № 9 показаны на рис. 3.

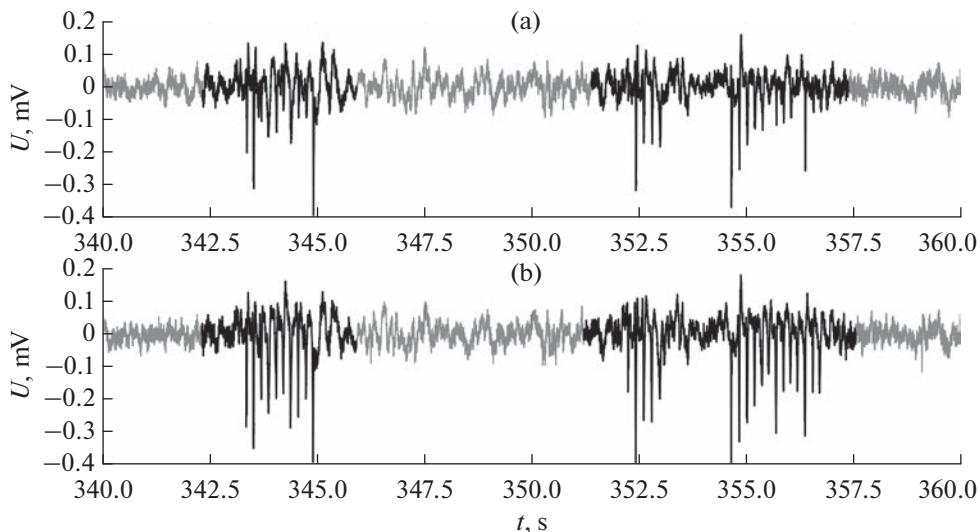
Результаты анализа оказались неоднозначными. Для крыс № 2, 4, 6 и 8 распределения длительности разрядов были очень похожи в обоих полушариях. Для остальных пяти крыс распределения в разных полушариях заметно отличались. Чтобы понять детали, дополнительно подробнее были проанализированы по 30 разрядов у крыс № 8 и № 9, то есть у одного животного, у которого заметных отличий в длине разрядов нет, и у одного, у которого длины разрядов в разных полушариях существенно различаются. Есть три типичные ситуации. Во-первых, в некоторых случаях разряды начинаются одновременно и имеют одинаковую длительность в обоих каналах, как видно из рис. 4. Для крысы № 8 все рассмотренные разряды относятся к этому типу.

Второй случай, когда в одном отведении разряды существенно менее выражены, чем в другом (в том числе по амплитуде, а также по форме и по наличию высших гармоник в спектре), поэтому они либо не обнаруживаются из-за недостаточно резких пиков, либо обнаруживаются с уменьшенной длиной (см. в качестве типичного примера рис. 5).

В некоторых случаях, как это показано на рис. 6, разряд явно развивается только в одном полушарии, в то время как в другом нет эпилептиформной активности, отличной от фона, поэтому нельзя сказать, что алгоритм обнаружения недостаточно чувствителен или что разряд асимметричен и лучше выражен в одном полушарии. Поскольку все три рассмотренных на рис. 4–6 случая были записаны у одного и того же животного в течение одного часа записи в произвольном порядке, гипотезы о том, что эти различия обусловлены положением электродов или какими-то эффектами во время записи, должны быть отвергнуты.

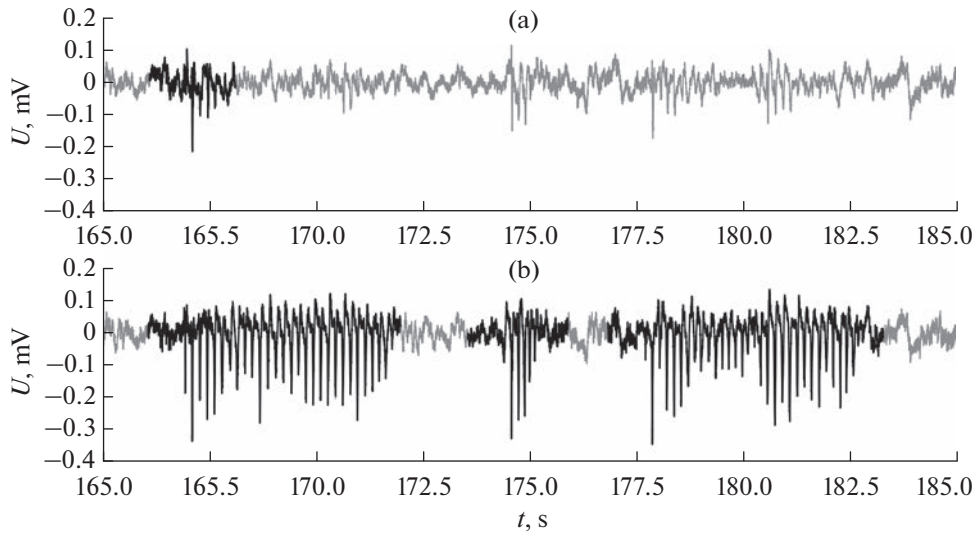


**Рис. 3.** Гистограммы распределения длительности разрядов для крыс № 8 и № 9. Желтый цвет — оценка распределения для разрядов в правом полушарии, серо-голубой — в левом. По оси X отложена длина разрядов, по оси Y — их количество.

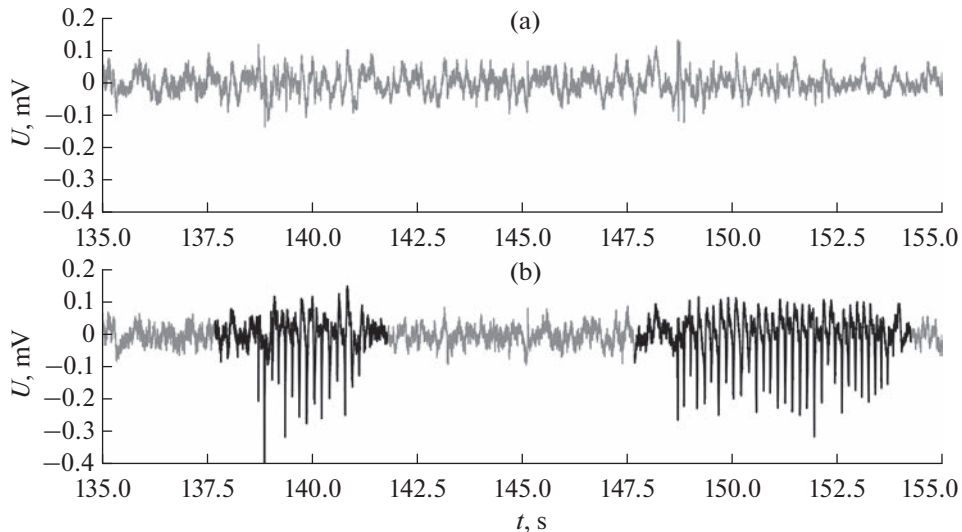


**Рис. 4.** Фрагмент записи электрической активности коры правого (а) и левого (б) полушарий крысы № 9. По оси X — время в с ( $t$ , s), по оси Y — напряжение ( $U$ , mV). Черным выделены участки, определенные алгоритмом как разряд.

Для количественного описания различий в продолжительности разрядов мы использовали два хорошо известных статистических теста: тест Колмогорова—Смирнова и тест Манна—Уитни. Программная реализация обоих тестов была взята из популярного пакета *scipy* [20]. Оба подхода проверяют гипотезу о том, что две выборки (в нашем случае это выборки длительности приступов в правом и левом полушариях) взяты из одного и того же распределения. Оба метода выдают значение



**Рис. 5.** Фрагмент записи электрической активности коры правого (а) и левого (б) полушарий крысы № 9. По оси  $X$  — время в с ( $t$ , s), по оси  $Y$  — напряжение ( $U$ , mV). Черным выделены участки, выделенные алгоритмом, серым — основной сигнал для сравнения.



**Рис. 6.** Фрагмент записи электрической активности коры правого (а) и левого (б) полушарий крысы № 9. По оси  $X$  — время в с ( $t$ , s), по оси  $Y$  — напряжение ( $U$ , mV). Черным выделены участки, выделенные алгоритмом, серым — основной сигнал для сравнения.

$p$  — вероятность ошибиться, опровергая гипотезу о том, что распределения одинаковы. Как правило, при малых значениях  $p$  делается вывод о значимых различиях, в то время как при относительно больших  $p$ , например,  $p > 0.05$ , исходная гипотеза принимается и выборки считаются принадлежащими одному и тому же распределению.

**Таблица 3.** Результаты тестирования на сходство распределений длин разрядов в левом и правом полушариях

| Номер крысы               | 1         | 2    | 3         | 4    | 5         | 6    | 7         | 8    | 9         |
|---------------------------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|
| Тест Колмогорова–Смирнова | $10^{-5}$ | 0.66 | $10^{-5}$ | 0.96 | $10^{-5}$ | 0.21 | $10^{-5}$ | 0.69 | $10^{-5}$ |
| Тест Манна–Уитни          | $10^{-5}$ | 0.48 | $10^{-5}$ | 0.59 | $10^{-5}$ | 0.31 | $10^{-5}$ | 0.29 | $10^{-5}$ |

Приведены значения  $p$  – вероятности ошибки, опровергающие гипотезу о том, что распределения совпадают. Первый ряд значений для теста Колмогорова–Смирнова, второй ряд значений для теста Манна–Уитни.

Для более удобного анализа данных значения  $p$  двух тестов были сведены в табл. 3. Для различных очень малых  $p < 10^{-5}$  в таблицу записывалось значение  $10^{-5}$ , поскольку различия между меньшими значениями на наших размерах выборки не имеют статистического смысла. Оба теста показали очень похожие результаты, четко различая две группы животных. Четыре крысы: № 2, 4, 6 и 8 имели симметричные разряды, и для них значения  $p$  большие –  $p > 0.2$ . Для пяти других животных: № 1, 3, 5, 7, 9 значения  $p < 10^{-5}$ , то есть распределения достоверно различные (даже если мы допустим поправку на множественное тестирование, сделав оценку сверху умножением полученных значений на число животных, все равно оба метода дадут  $p < 10^{-4}$ ). Как видно из рис. 4, это не означает, что все разряды у этих животных разные, но некоторые или многие из них либо разной длины (например, см. рис. 5), либо развиваются только в одном полушарии (например, см. рис. 6).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе анализировалась длительность пик-волновых разрядов у крыс с вызванными системным введением ПТЗ абсансами. Анализ производился по отдельности для правого и левого полушарий с целью выявить, в какой степени пик-волновые разряды симметричны. Для непредвзятого определения длины пик-волновых разрядов был предложен и реализован простой алгоритм обнаружения пик-волновых комплексов, для которого были определены специфичность и чувствительность, оказавшиеся достаточно высокими для решения поставленной задачи.

Было показано, что распределение длительности пик-волновых разрядов в разных полушариях отличается у пяти из девяти проанализированных животных и одинаково у остальных четырех. У животных с разным распределением наблюдаются как симметричные билатеральные, так и асимметричные (в одном полушарии короче, чем в другом) разряды и разряды, локализованные только в одном полушарии. Поскольку все животные принадлежат к одной и той же линии Wistar, сходны по массе тела, одного пола и возраста, оперировались одинаково, это означает, что существует индивидуальная предрасположенность к генерации двусторонних или односторонних разрядов. При этом сосуществование как симметричных, так и односторонних разрядов у одних и тех же животных может указывать на наличие как минимум двух различных механизмов запуска эпилептиформной активности абсансного типа, в то время как у четырех животных с симметричными разрядами один из этих механизмов не реализуется.

Выявленные особенности динамики эпилептиформной активности характеризуют именно рассмотренную фармакологическую модель абсансных судорог. По результатам данного исследования нельзя сказать, имеют ли пик-волновые разряды у генетических моделей (крысы WAG/Rij и GAERS) такие же индивидуальные

свойства. Но если это так, то это может объяснить, почему эволюция связности во время абсансных приступов сильно различается в популяции, как это было показано в ранее опубликованных работах [21, 22] с использованием различных мер связанности. Кроме того, при рассмотрении распространяющейся депрессии, инициированной инъекцией ПТЗ, односторонний или двусторонний тип волны депрессии может основываться на одном и том же механизме индивидуальной предрасположенности, что и при возникновении симметричных или асимметричных пик-волновых разрядов. Эти вопросы, несомненно, требуют дальнейшего изучения.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводились в соответствии с нормами Европейского Сообщества, разработанными для экспериментов на животных и одобренными этической комиссией по экспериментам над животными (Этическая комиссия Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, протокол № 1 от 11.02.2022 г.).

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00327, <https://rscf.ru/project/22-15-00327/>).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, в том числе, связанного с финансовой поддержкой РНФ (Грант № 22-15-00327).

### ВКЛАД АВТОРОВ

А.С.Е. — обработка экспериментальных данных: спектральный анализ, разметка, статистический анализ. Е.М.С. — реализация эксперимента, получение данных. А.А.Г. — идея и реализация метода автоматической разметки приступов, написание текста статьи. Л.В.В. — материальное обеспечение работы, идея эксперимента, контроль результатов эксперимента, написание текста. И.В.С. — идея и концепция работы, общее руководство, в том числе выбор методов статистического анализа, написание текста публикации.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Coenen A, van Luijtelaar G* (2003) Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet* 33(6): 635–655.  
<https://doi.org/10.1023/a:1026179013847>
2. *Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A* (1992) Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg - a review. *J Neural Transmis Suppl* 35: 37–69.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9206-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9206-1_4)
3. *Akman O, Demiralp T, Ates N, Onat FY* (2010) Electroencephalographic differences between WAG/Rij and GAERS rat models of absence epilepsy. *Epilepsy Res* 89(2): 185–193.  
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.12.005>
4. *van Rijn CM, Gaetani S, Santolini I, Badura A, Gabova A, Fu J, Watanabe M, Cuomo V, van Luijtelaar G, Nicoletti F, Ngomba RT* (2010) WAG/Rij rats show a reduced expression of CB1 receptors in thalamic nuclei and respond to the CB1 receptor agonist, R(+)WIN55,212-2, with a reduced incidence of spike-wave discharges. *Epilepsia* 51(8): 1511–1521.  
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02510.x>
5. *Jafarian M, Esmail AM, Karimzadeh F* (2020) Experimental Models of Absence Epilepsy. *Basic Clin Neurosci* 11(6): 715–726.  
<https://doi.org/10.32598/bcn.11.6.731.1>
6. *Marescaux C, Micheletti G, Vergnes M, Depaulis A, Rumbach L, Warter JM* (1984) A Model of Chronic Spontaneous Petit Mal-like Seizures in the Rat: Comparison with Pentylentetrazol-Induced Seizures. *Epilepsia* 25(3): 326–331.  
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1984.tb04196.x>

7. Medina AE, Manhaes AC, Schmidt SL (2001) Sex differences in sensitivity to seizures elicited by pentylenetetrazol in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 68(3): 591–596.  
[https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00466-x](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00466-x)
8. Solmaz I, Gürkanlar D, Gökçil Z, Göksoy C, Özkan M, Erdogan E (2009) Antiepileptic activity of melatonin in guinea pigs with pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurol Res* 31(9): 989–995.  
<https://doi.org/10.1179/174313209X385545>
9. Klioueva IA, van Luijtelea ELJM, Chepurnova NE, Chepurnov SA (2001) PTZ-induced seizures in rats: effects of age and strain. *Physiol Behav* 72(3): 421–426.  
[https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(00\)00425-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(00)00425-x)
10. Shandra AA, Godlevsky LS (2005) Pentylenetetrazol-Induced Kindling as a Model of Absence and Convulsive forms of Epilepsy. In: Corcoran ME, Mosh'e SL (eds) *Kindling 6. Advances in Behavioral Biology*, 55. Springer. Boston. MA.  
[https://doi.org/10.1007/0-387-26144-3\\_6](https://doi.org/10.1007/0-387-26144-3_6)
11. Vergnes M, Marescaux C (1992) Cortical and thalamic lesions in rats with genetic absence epilepsy. In: Marescaux C, Vergnes M, Bernasconi R (eds) *Generalized Non-Convulsive Epilepsy: Focus on GABA-B Receptors*. J Neur Transmis 35. Springer. Vienna.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9206-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9206-1_5)
12. Vinogradova LV, Koroleva VI (1993) Cortico-caudate spreading depression and seizure activity induced by systemic daily pentylenetetrazole injection in rats. *Pavlov J High Nerv Act* 43(4): 683–694.
13. Koroleva VI, Vinogradova LV, Bures J (1993) Reduced incidence of cortical spreading depression in the course of pentylenetetrazol kindling in rats. *Brain Res* 608(1): 107–114.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90780-q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90780-q)
14. Crunelli V, Leresche N (2002) Childhood absence epilepsy: Genes, channels, neurons and networks. *Nat Rev Neurosci* 3: 371–382.  
<https://doi.org/10.1038/nnr811>
15. Vinogradova LV, Vinogradov VY, Kuznetsova GD (2006) Unilateral cortical spreading depression is an early marker of audiogenic kindling in awake rats. *Epilepsy Res* 71(1): 64–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.05.014>
16. Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier. Amsterdam, Boston.
17. Ovchinnikov A, Luttjohann A, Hramov A, van Luijtelea G (2010) An algorithm for real-time detection of spike-wave discharges in rodents. *J Neurosci Methods* 194(1): 172–178.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.09.017>
18. van Luijtelea G, Luttjohann A, Makarov VV, Maksimenko VA, Koronovskii A, Hramov AE (2016) Methods of automated absence seizure detection, interference by stimulation, and possibilities for prediction in genetic absence models. *J Neurosci Methods* 260: 144–158.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.07.010>
19. Grishchenko AA, Sysoeva MV, Sysoev IV (2020) Detecting the primary time scale of evolution of information properties for local field potentials in brain at absence epilepsy. *Izvestiya VUZ. Appl Nonlin Dynam* 28(1): 98–110.  
<https://doi.org/10.18500/0869-6632-2020-28-1-98-110>
20. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, Burovski E, Peterson P, Weckesser W, Bright J, van der Walt SJ, Brett M, Wilson J, Jarrod Millman K, Mayorov N, Nelson ARJ, Jones E, Kern R, Larson E, Carey C, Polat I, Feng Y, Moore EW, Vand erPlas J, Laxalde D, Perktold J, Cimrman R, Henriksen I, Quintero EA, Harris CR, Archibald M, Ribeiro AH, Pedregosa F, van Mulbregt P, Contributors S (2020) *SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python*. *Nat Methods* 17: 261–272.  
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
21. Grishchenko AA, van Rijn CM, Sysoev IV (2017) Comparative Analysis of Methods for Estimation of Undirected Coupling from Time Series of Intracranial EEGs of Cortex of Rats— Genetic Models of Absence Epilepsy. *Math Biol Bioinf* 12(2): 317–326.  
<https://doi.org/10.17537/2017.12.317>
22. Grishchenko AA, Sysoeva MV, Medvedeva TM, van Rijn CM, Bezruchko BP, Sysoev IV (2020) Comparison of approaches to directed connectivity detection in application to spike-wave discharge study. *Cybernet and Physics* 9(2): 86–97.  
<https://doi.org/10.35470/2226-4116-2020-9-2-86-97>

## Interhemispheric Symmetry and Asymmetry of Absence Type Spike-Wave Discharges Caused by Systemic Administration of Pentylenetetrazole

A. S. Ershova<sup>a</sup>, E. M. Suleymanova<sup>b</sup>, A. A. Grishchenko<sup>a, \*</sup>,  
L. V. Vinogradova<sup>b</sup>, and I. V. Sysoev<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Saratov State University, Saratov, Russia*

<sup>b</sup> *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Science, Moscow, Russia*

*\*e-mail vili\_von@mail.ru*

Absence epilepsy is a specific generalized non-convulsive form occurring almost exclusively in children and adolescents. It is traditionally thought that the resulting seizure is completely generalized in the cortex of both hemispheres, as seen in humans on surface electroencephalograms and magnetoencephalograms. However, most studies were performed on animals, mainly rats — genetic (WAG/Rij and GAERS lines) and pharmacological models, since signals not only from the cortex, but also from subcortical structures such as the thalamus must be measured, what cannot be done on humans, who have no medical indications for intracranial surgery. In animals, measurements of local field potentials were almost always made from one hemisphere in order to cover the maximum number of brain structures involved. At the same time, the degree of synchrony of seizure onsets and terminations in different hemispheres in animals was practically not studied, and the markup itself in the vast majority of cases was done on the basis of one channel from motor or somato-sensory cortex. This work aims to reveal differences and similarities in the course of spike-wave discharges (the main encephalographic marker of absence seizures) in the cortex of the two hemispheres in a known pharmacological model of rats exposed to pentylenetetrazole. For discharge detection, a method of automatic discharge marking is proposed and its sensitivity and specificity are evaluated using records of nine animals. We used it to mark seizures in symmetrical cortical sites from both hemispheres separately. According to the results of the analysis of seizure duration it turned out that for five out of nine animals the distribution of discharges significantly differed between the hemispheres, and for the other four was equal. Consequently, in the rat model, spike-wave activity may be generalized both symmetrically and asymmetrically, which may be due to individual peculiarities or different discharge triggering scenarios.

**Keywords:** epilepsy, pentylenetetrazole, brain asymmetry, automatic discharge detection, EEG, animal models of epilepsy

---

---

МЕТОДИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

---

---

**ПРИМЕНЕНИЕ МАЛОИНВАЗИВНОГО БЕСПРОВОДНОГО МЕТОДА  
РЕГИСТРАЦИИ ЭЭГ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАГРУЗОК ДЛЯ ОЦЕНКИ  
ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ У САМЦОВ КРЫС  
В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ**

© 2023 г. Д. С. Синяк<sup>1</sup>, Г. А. Буков<sup>1</sup>, В. В. Сизов<sup>2</sup>, О. Е. Зубарева<sup>1</sup>,  
Д. В. Амахин<sup>1</sup>, А. В. Зайцев<sup>1, \*</sup>

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

<sup>2</sup>*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия*

*\*E-mail: aleksey\_zaitsev@mail.ru*

Поступила в редакцию 10.01.2023 г.

После доработки 14.01.2023 г.

Принята к публикации 15.01.2023 г.

В исследованиях последних лет показано, что важную роль в патогенезе многих нервно-психических заболеваний, таких как ишемия тканей мозга, черепно-мозговая травма, нейродегенеративные заболевания, эпилепсия и др., играет нейровоспаление. Поэтому при регистрации ЭЭГ в экспериментальных моделях этих заболеваний предпочтительнее использовать неинвазивные методы, чтобы исключить нейровоспаление. Однако такие подходы используются редко, так как у животных сложно осуществить надежную регистрацию ЭЭГ без использования вживленных электродов. В данной работе предложено новое устройство для малоинвазивной беспроводной регистрации ЭЭГ у крыс. Электроды располагаются на поверхности черепа и закрепляются прижимными язычками, расположенными на специальной платформе, закрепленной на черепе с помощью винтов. Данная конструкция позволяет избежать повреждения ткани мозга. Операция малотравматична, и регистрация ЭЭГ может быть произведена уже через 2–3 дня после нее. Высокая надежность крепления электродов позволяет производить длительную многомесячную регистрацию. Данный метод регистрации ЭЭГ апробирован на литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Запись ЭЭГ у экспериментальных и контрольных крыс была произведена в фоновых условиях и при использовании функциональных нагрузок – ритмической фото- и фоностимуляции, а также депривации сна. Показано, что эти функциональные нагрузки позволяют усилить выраженность эпилептиформных проявлений на ЭЭГ (частоты спайков), максимальные различия между группами проявляются при комбинации названных нагрузок. Таким образом, основной особенностью предлагаемого устройства для записи ЭЭГ является то, что оно позволяет проводить длительные исследования ЭЭГ на свободно двигающейся крысе без развития возможного нейровоспаления. Данное устройство может быть использовано в экспериментах по изучению эпилептогенеза и тестированию новых противоэпилептических препаратов на экспериментальных животных.

*Ключевые слова:* ЭЭГ, эпилепсия, ритмическая фотостимуляция, ритмическая фоностимуляция, функциональные нагрузки, депривация сна, икталная и интерикталная активность

**DOI:** 10.31857/S0869813923020097, **EDN:** NEBKYR

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы выявлено, что в патогенезе многих нейропсихических расстройств важную роль играет развитие нейровоспаления [1–3]. Одним из таких видов заболеваний является эпилепсия. Несмотря на многочисленные исследования и доступность большого количества противосудорожных препаратов, около трети больных эпилепсией страдают фармакорезистентной формой заболевания [4, 5].

Регистрация ЭЭГ является основным методом диагностики состояния нервной системы у больных эпилепсией. Эпилептиформная активность у пациентов выражается в появлении на ЭЭГ особой иктальной (полиспайки и спайк-волны, регистрируемые в течение десятков секунд) и интериктальной биоэлектрической активности (одиночных высокоамплитудных спайков, острых волн, комплексов спайк-волна, острых волн, полиспайков) [6]. Схожие изменения наблюдаются и у лабораторных грызунов в модели височной эпилепсии [7]. В большинстве опубликованных работ при регистрации ЭЭГ у животных используются вживленные электроды [8–10], что может усугублять воспалительные процессы, связанные с основной патологией, а это не позволяет получить объективную картину патологического процесса. В частности, на модели с внутримозговым введением бактериального липополисахарида было доказано, что бактериальное загрязнение, часто сопровождающее внутримозговую имплантацию электродов, может усиливать эпилептиформную активность (частоту и длительность спайк-волн) [11].

Поэтому при проведении исследований, ориентированных на изучение роли нейровоспаления в патогенезе эпилепсии (как и других заболеваний) предпочтительно использовать неинвазивные методы регистрации ЭЭГ. При этом важно, чтобы конструкция позволяла проводить длительную многодневную регистрацию ЭЭГ на свободно перемещающемся животном, то есть передача данных была беспроводной. Отработка такого метода явилась первой задачей данного исследования.

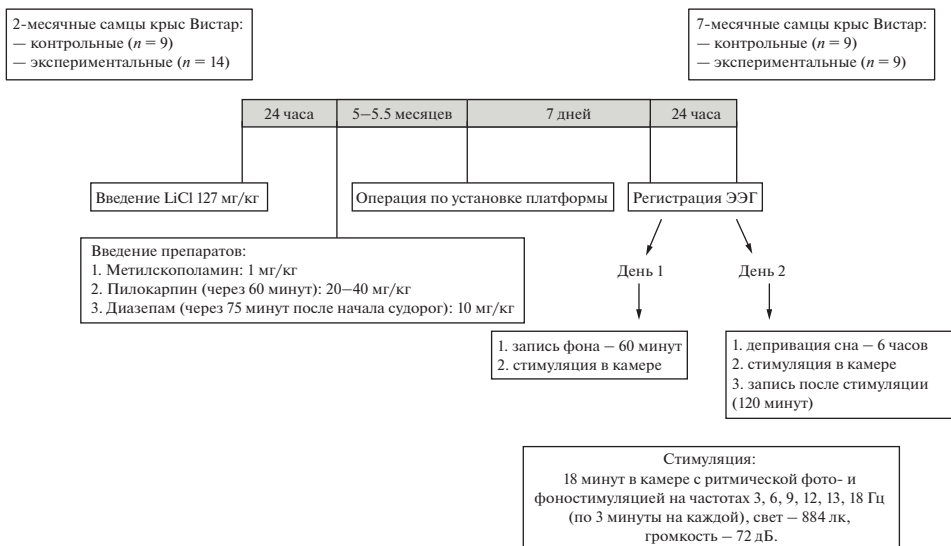
Вторая задача заключалась в оценке целесообразности использования функциональных нагрузок: ритмической фото- и фоновостимуляции (РФФС) и депривации сна для оценки выраженности эпилептиформной активности в экспериментальной модели эпилепсии. Эти виды стимуляции широко используются при проведении ЭЭГ исследований у больных эпилепсией, они облегчают выявление патологической биоэлектрической активности, которая может не проявиться при регистрации фоновой ЭЭГ [12, 13]. Однако в экспериментальных исследованиях эпилепсии при регистрации ЭЭГ функциональные нагрузки практически не используются.

В работе использована литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии. Она позволяет достаточно точно воспроизвести процессы эпилептогенеза, наблюдаемые при развитии эпилепсии у человека [14]. Так же, как и при патологии человека, после острых судорог, возникающих сразу после введения пилокарпина и имитирующих первоначальное повреждающее воздействие на мозг, имеет место латентный период, когда внешне судороги еще не проявляются, но в ткани мозга идут проэпилептические изменения, которые в дальнейшем приведут к формированию спонтанных рецидивирующих судорог [14]. При развитии патологических процессов в этой модели большую роль играет нейровоспаление [15, 16].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Экспериментальные животные*

Работа выполнена на самцах крыс Вистар. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 22°C со свободным доступом к воде и пище при световом режиме — с 8:00 до 20:00 — свет, с 20:00 до 8:00 — темнота.



**Рис. 1.** Схема эксперимента. На временной шкале представлены основные этапы исследования. Эксперимент проводился на самцах крыс Вистар. В возрасте 2 месяцев у экспериментальных животных индуцировали височную эпилепсию путем введения пилокарпина. После развития хронической эпилепсии (в возрасте 7–7,5 месяцев), животным устанавливали платформу с электродами для записи ЭЭГ. После этого в течение двух суток регистрировали эпилептиформную активность: в первый день без депривации сна, во второй — после 6 ч депривации сна. Каждый экспериментальный сеанс состоял из записи фоновой ЭЭГ и записи ЭЭГ во время ритмической фоно- и фотостимуляции.

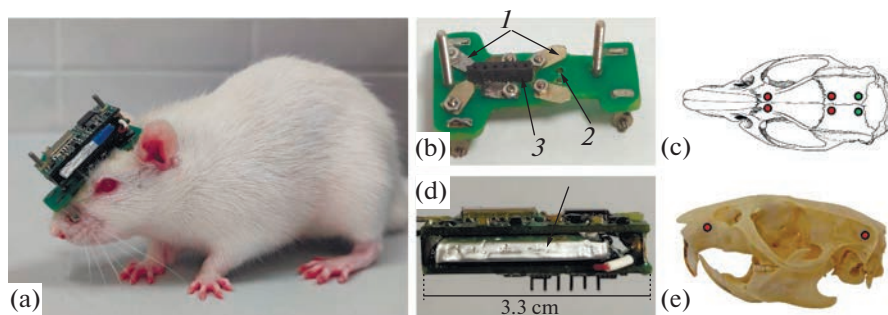
### *Литий-пилокарпиновая модель*

Индукцию литий-пилокарпиновых судорог (рис. 1) проводили в возрасте 8 нед. у 14 крыс. За сутки до инъекций пилокарпина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) крысам вводили LiCl в/б в дозе 127 мг/кг. За час до введения пилокарпина — метилскополамин (1 мг/кг; в/б) для предотвращения периферических эффектов конвульсанта. Пилокарпин вводили в/б в суммарной дозе 20–40 мг/кг (2–4 инъекции, по 10 мг/кг, с 30-минутными интервалами, до тех пор, пока припадки не достигали стадии 4 (rearing) по шкале Расина [17]).

Через 75 мин после начала 4-й стадии судороги купировали введением диазепама (10 мг/кг, в/б, Московский эндокринный завод, Россия). В исследование были включены только крысы, у которых развилась 4-я стадия припадка по шкале Расина [17]. Три крысы, которым вводили пилокарпин, были исключены в связи со слабыми судорогами, еще 2 погибли в течение первой недели после введения конвульсанта. В основной эксперимент были включены 9 животных. В течение первой недели после введения пилокарпина крыс кормили влажным кормом (каши, фрукты) и в случае потери веса вводили им 5%-ный раствор глюкозы (подкожно, 2–3 мл). Далее крыс содержали небольшими группами по 4–5 животных в клетке до достижения возраста 7–7,5 мес. и начала экспериментов с регистрацией ЭЭГ. Контрольным животным ( $n = 9$ ) вводили LiCl и метилскополамин без пилокарпина.

### *Метод неинвазивной регистрации ЭЭГ у свободно двигающихся крыс*

Было разработано новое устройство для получения записей ЭЭГ от свободно двигающихся крыс. Устройство состоит из трех частей: 1) платформа с электрода-



**Рис. 2.** Технические характеристики устройства для регистрации. (а) Собранное регистрирующее устройство, закрепленное на черепе крысы. (б) Общий вид платформы: 1 – зажимы для электрода; 2 – отверстие для электрода; 3 – разъем для подключения к передатчику. (с) Схема расположения регистрирующих (красные точки) и индифферентных электродов (зеленые точки) электродов. (д) Четырехканальный передатчик с интегрированным усилителем. Стрелкой отмечен сменный литий-полимерный аккумулятор. (е) Расположение крепежных винтов на черепе крысы (красные точки).

ми, которая крепится к черепу животного (рис. 2а, б); 2) съемный блок, состоящий из передатчика и батареи (указана стрелкой) (рис. 2д); 3) приемник, который вставляется в USB-порт персонального компьютера. Платформа крепится к черепу животного с помощью кронштейнов с крепежными винтами в нижней части и по бокам (рис. 2а). Сверху платформы располагается разъем для передатчика (рис. 2б, 3). Регистрирующие микроэлектроды, изготовленные из серебряной проволоки диаметром 0.5 мм, частично изолированы для более плотного размещения в отверстиях на платформе (рис. 2б, 2). Неизолированная часть электрода вставлялась в отверстие в платформе (рис. 2б, 2), а изолированная часть крепилась металлическими зажимами к верхней части платформы (рис. 2б, 1). Электроды фиксируются с помощью прижимных металлических фиксаторов (рис. 2б, 1). Неизолированная, располагаемая на черепе регистрирующая часть электродов, составляет примерно 1 мм в длину. Схема расположения регистрирующих и индифферентных электродов показана на рис. 2с. Мы использовали 2 индифферентных и 4 регистрирующих электрода. При многодневной регистрации, в случае необходимости, электроды могут быть легко подправлены или заменены без применения наркоза.

Непосредственно перед регистрацией ЭЭГ на платформе размещается 4-канальный модуль усилителя и модуль передатчика (рис. 2д, электрическая схема устройства доступна по следующей ссылке <https://disk.yandex.ru/d/I0eHvWxis-3g2w>). Используются входные усилители INA333 и промежуточные усилители ОРА2349 (Texas Instruments Incorporated, США), они обеспечивают хорошее подавление синфазной помехи (100 дБ) и низкий уровень шумов (<1 мкВ) в полосе пропускания (0.1–75 Гц). Оцифровка осуществляется с частотой 250 Гц и разрешением 16 бит сигма-дельта АЦП, встроенным в микроконтроллер STM32F373 (STMicroelectronics, Швейцария).

Положение головы животного регистрируется 3-осевым акселерометром LIS2DW12 (STMicroelectronics) с частотой 100 Гц и разрешением 16 бит в диапазоне  $\pm 2$  г. Передача данных осуществляется по каналу Bluetooth модулем SPBTLE-1S (STMicroelectronics). Регистрация сигналов ЭЭГ и передача по радиоканалу разнесены во времени, чтобы шумов было меньше. Сменный литий-полимерный аккумулятор обеспечивает непрерывную работу модуля в течение 10 ч. Масса модуля с аккумулятором составляет 15 г. Приемник разработан на базе SPBTLE-1S и

STM32F373 (STMicroelectronics). Он обеспечивает мост с радиоканала на USB-порт компьютера. Программа регистрации позволяет вести непрерывную многочасовую запись ЭЭГ, показаний акселерометра и меток пользователя в формате EDF. Длительность однократной записи лимитируется временем работы аккумулятора (приблизительно 10 ч). Замена аккумулятора производится в течение менее одной минуты.

Установку платформы производили под изофлурановым наркозом. Платформу закрепляли на черепе с помощью простерилизованных стопорных винтов из нержавеющей стали (рис. 2b). Крепежные винты были прикреплены к носовой и теменной кости (рис. 2b). Далее, через отверстия на платформе с помощью ручного сверла диаметром 0.6 мм производили расчистку посадочных углублений для установки микроэлектродов. Вращательными движениями из посадочных мест удаляли частички мягких тканей до кости черепа. Прочистка посадочного углубления сопровождалась прижиганием в целях достижения дополнительной стерильности и лучшего контакта микроэлектрода с черепом. Electrodes помещали в отверстия и фиксировали зажимом (рис. 2b, 1). После завершения операции места фиксации платформы в области вкрученных винтов обрабатывали антисептиком, после чего прооперированных крыс помещали в индивидуальные контейнеры со свободным доступом к воде и корму. Поскольку операция малотравматична, регистрацию ЭЭГ можно производить уже через 2–3 дня после нее. Крепление платформы очень надежное, крысы не снимают платформу при проведении многодневных исследований.

Регистрацию ЭЭГ у экспериментальных и контрольных крыс производили в течение двух дней. В первый день регистрировали фоновую ЭЭГ на протяжении 60 мин в домашней клетке, после чего запись ЭЭГ проводилась при РФФС (30 мин). Во второй день РФФС (и одновременная регистрация ЭЭГ) осуществлялась непосредственно после депривации сна, после чего крысу возвращали в домашнюю клетку и записывали ЭЭГ без стимуляции на протяжении 120 мин, в течение которых животное, как правило, засыпало. Дополнительно с помощью веб-камеры регистрировали поведение крысы.

### *Метод РФФС*

Для проведения РФФС животное помещали в темную вентилируемую и звукоизолированную камеру, в которой располагался динамик и источник света, в качестве которого использованы сверхъяркие светодиоды белого свечения C513A-WSS-CV0Y0151 (30 штук). Перед стимуляцией животным позволяли адаптироваться к новой среде в течение 10 мин. Далее проводили РФФС на частотах 3, 6, 9, 12, 13 и 18 Гц, по 3 мин на каждой частоте без паузы между сериями с разной частотой. Длительность одного стимула в пачке — 1 мс. Освещенность пола установки при вспышках света составляла 884 лк, сила звука — 80 дБ.

### *Метод депривации сна*

Использовали метод депривации сна с применением орбитального шейкера [18, 19]. В начале светового дня (с 8:30 до 14:30) крыс в индивидуальных контейнерах помещали на орбитальный шейкер (S-3L.A20, ELMi, Латвия), обеспечивающий непрерывное орбитальное вращение при частоте 175 об./мин.

### *Обработка сигналов*

Записи ЭЭГ обрабатывали при помощи программы Spike Searcher, разработанной в лаборатории на основе программного пакета Wolfram Mathematica 12 (Wol-

fram Research, Champaign, IL, США). Исходный код программы доступен по ссылке <https://disk.yandex.ru/d/I0eHvWxis-3g2w>.

Алгоритм обработки ЭЭГ записей состоял из следующих этапов.

(1) Полученные записи подвергались визуальному осмотру. Фрагменты записи с чрезмерным электрическим шумом или сильной двигательной активностью (полученные по данным акселерометра) отбрасывались. Также выделяли фрагменты записи с иктальной активностью, сопровождавшей двигательные судороги, их анализ производили отдельно от интериктальных эпизодов.

(2) Для описания интериктальной активности осуществляли поиск одиночных спайков и спайк-волн, а также одиночных полиспайков. Спайк определяли как пароксизмальный электрический разряд на ЭЭГ, четко отличающийся от фоновой активности, имеющий острый пик и длительность от 20 до 80 мс, с амплитудой не менее 3 стандартных отклонений от фоновой записи каждой крысы (рис. 3b). Полиспайк — комплекс из как минимум трех последовательных спайков (рис. 3b). Спайк-волну определяли как комплекс элементов, сочетающих спайк с последующей медленной волной (рис. 3c). Сначала проводили предварительное автоматическое определение спайков и спайк-волн. Затем результаты автоматического обнаружения проверяли вручную и при необходимости корректировали. Координаты и амплитуды найденных спайков и спайк-волн автоматически заносили в базу данных.

(3) Далее, в качестве показателей интериктальной эпилептиформной активности мы рассчитывали частоту одиночных спайков [7]. В качестве показателя иктальной активности анализировали длительность полиспайковой активности.

#### *Статистическая обработка данных*

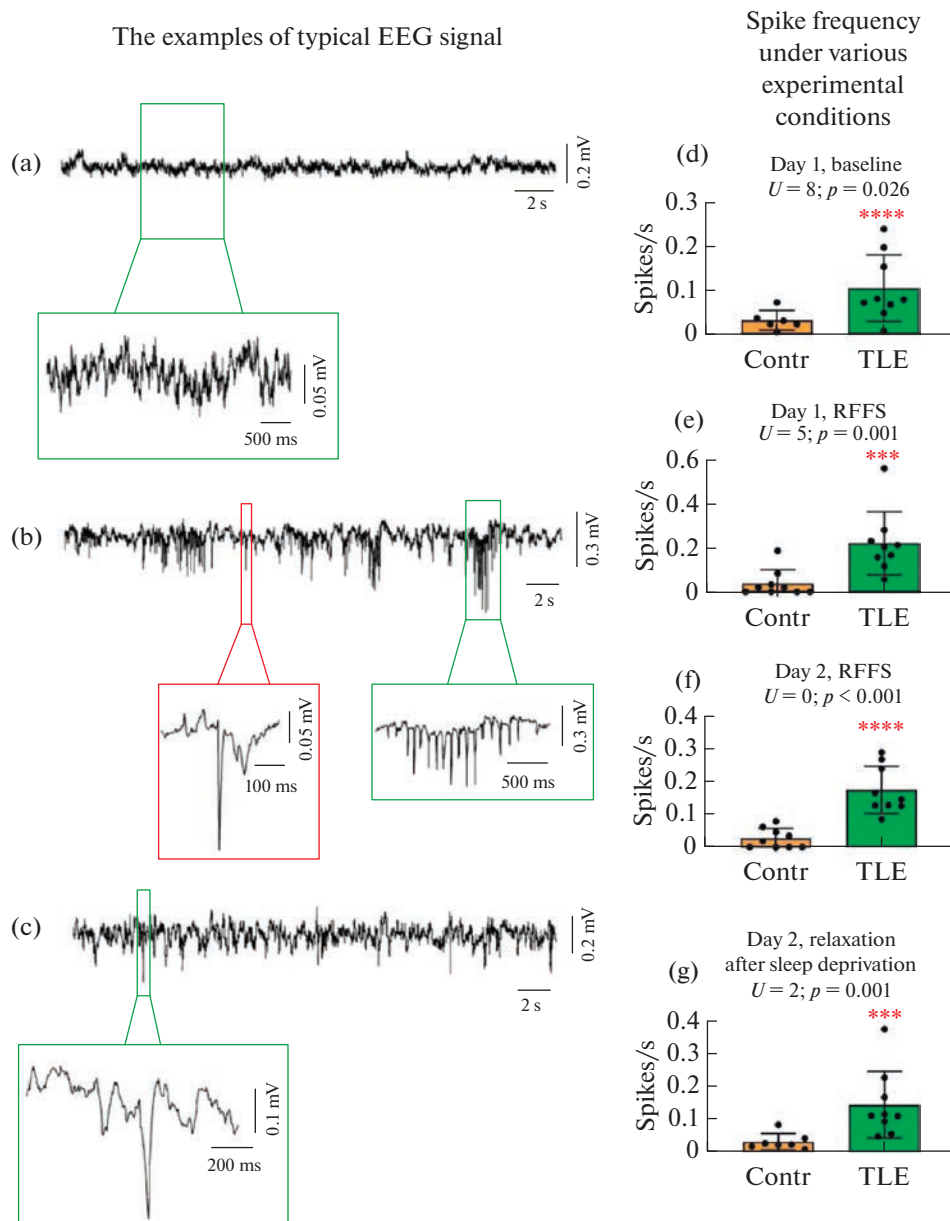
Статистический анализ проводился с помощью программ IBM SPSS Statistics (IBM, США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Поскольку распределение частоты одиночных спайков не было нормальным, для сравнения экспериментальной и контрольной групп по данному показателю применяли *U*-критерий Манна—Уитни. При этом различия показателей в фоне и при отдельных функциональных нагрузках по показателю частоты одиночных спайков выявляли с помощью *T*-критерия Вилкоксона. Для сравнения длительности моторных судорог и продолжительности высокоамплитудной полиспайковой активности (эти данные были распределены нормально) использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при  $p \leq 0.05$ . Данные на графиках представлены как среднее и стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Каждая точка на графике соответствует конкретному животному.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### *Анализ фоновой ЭЭГ*

К возрасту 7–7.5 мес. спонтанные судороги были отмечены на видеозаписях у всех крыс экспериментальной группы и не были выявлены у контрольных животных. Таким образом, височная эпилепсия развилась у всех животных экспериментальной группы.

Сначала мы сравнили фоновую ЭЭГ в двух группах животных. Записывающее ЭЭГ устройство не вызывало у животных чрезмерного беспокойства, они не пытались избавиться от него и вели себя нормально. Примеры записи ЭЭГ у контрольных и модельных крыс в обычном состоянии представлены на рис. 3а–с. У большинства животных с эпилепсией наблюдались одиночные высокоамплитудные спайки и комплексы спайк-волна с частотой от 0.006 до 0.23 спайков/с. Также встречались единичные комплексы спайк-волна и одиночные полиспайки (рис. 3b, c).



**Рис. 3.** Показатели эпилептиформной активности (спайки) и их выраженность в различных экспериментальных условиях. (а–с) Репрезентативные примеры ЭЭГ контрольных (а) и экспериментальных крыс (б–с) в фоне (без функциональных нагрузок). В рамках показаны увеличенные фрагменты: (а) отсутствие эпилептиформных событий; (б) красная рамка – одиночный спайк, зеленая рамка – полиспайк; (с) рамка – спайк-волна. (d–g) Показатели эпилептиформной активности в различных экспериментальных условиях: (d) день 1, фон без стимуляции; (е) день 1, во время фото- и фоностимуляции (RFFS); (f) день 2, во время фото- и фоностимуляции (RFFS), непосредственно после депривации сна; (g) отдых после стимуляции и депривации сна. Данные на гистограммах представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Каждая точка – значения конкретного животного.

У контрольных животных высокоамплитудные спайки встречались реже (частота от 0.004 до 0.07 спайков/с, тест Манна–Уитни:  $U = 8$ ;  $p = 0.03$ , рис. 3d). Таким образом, одиночные спайки, встречающиеся с высокой частотой, можно использовать как признак эпилепсии.

Однако, несмотря на статистические различия между группами, частоты спайков в контрольной и экспериментальной группах существенно пересекались. Частота спайков во время фоновой записи ЭЭГ была относительно низкой в обеих группах. Схожие проблемы наблюдаются при диагностике эпилепсии у людей, при одиночной регистрации ЭЭГ у некоторых больных выявить эпилептиформную активность не удается, в этом случае для облегчения диагностики применяют функциональные нагрузки, в частности ритмическую фотостимуляцию и депривацию сна [12, 13]. Поэтому мы решили использовать данный подход для выявления выраженности эпилептиформной активности у крыс с височной эпилепсией.

#### *Анализ ЭЭГ при функциональных нагрузках (РФФС и депривации сна)*

При РФФС частота одиночных спайков не зависела от режима стимуляции (3, 6, 9, 12, 13, 18 Гц) ни у экспериментальных крыс, ни у контрольных животных, поэтому она была проанализирована суммарно за весь период стимуляции.

При РФФС частота спайков по сравнению с фоном возрастала у животных в экспериментальной группе в 2.2 раза (тест Вилкоксона,  $T = 4$ ;  $p = 0.03$ ;  $n = 9$ ). В контрольной группе частота не изменилась. В этих условиях различий между группами были более явными, чем в фоне (рис. 3е; тест Манна–Уитни,  $U = 5$ ;  $p < 0.001$ ).

Депривация сна совместно с РФФС при регистрации во второй экспериментальный день также не влияла на частоту спайков у контрольных животных, однако увеличивала их у животных с эпилепсией ( $T = 5$ ;  $p = 0.04$ ;  $n = 9$ ); различия между группами тоже стали более выраженными ( $U = 0$ ;  $p < 0.001$ , рис. 3ф). В этих условиях распределения данных контрольной и экспериментальных групп не пересекались. Кроме того, депривация сна вызвала у нескольких экспериментальных крыс спонтанные рецидивирующие судороги (более подробный анализ приведен ниже).

Мы также проанализировали ЭЭГ у контрольных и экспериментальных крыс в период отдыха, после депривации сна и РФФС. В течение этого периода (2 ч регистрации) все животные засыпали, о чем можно было судить по наблюдению за их поведением и данным акселерометра. Из клинических исследований известно, что частота эпилептиформных разрядов у больных эпилепсией возрастает во время сна [20]. Анализ полученных нами данных показывает, что в этих экспериментальных условиях различия между группами по показателям одиночных спайков остаются статистически значимыми (рис. 3г;  $U = 2$ ;  $p = 0.001$ ). Следует отметить, что при отдыхе после депривации сна и РФФС несколько увеличивалась вероятность появления спонтанных рецидивирующих судорог (см. ниже).

Таким образом, различия между группами животных максимально выражены при использовании функциональных нагрузок.

#### *Анализ иктальной активности*

За время записи ЭЭГ у экспериментальных крыс было зарегистрировано 7 эпизодов спонтанных двигательных судорог. Они наблюдались у 4 экспериментальных крыс из 9, причем у одной крысы они отмечались трижды, еще у одной — дважды, и у двух — по одному разу. Только у одного животного судороги проявились в первый экспериментальный день (в условиях без депривации сна), и у всех 4 — во второй экспериментальный день, после депривации сна (при РФФС и/или отдыхе после функциональных нагрузок), то есть применение РФФС и депривации сна уве-

личивает вероятность появления спонтанных судорог. У контрольных животных судорог не было обнаружено ни при каких условиях.

На ЭЭГ во время судорог появлялась высокоамплитудная полиспайковая (комплексы спайк-волна) активность (рис. 4а), которая была более длительной, чем собственно двигательные судороги: средняя продолжительность моторных судорог у крыс составила  $10.3 \pm 3.0$  с, средняя длительность высокоамплитудной полиспайковой активности —  $46.4 \pm 7.9$  с (парный тест  $t = 10.5$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 7$ ).

Таким образом, проведенное нами исследование доказало, что предложенная новая методика регистрации ЭЭГ может быть использована для анализа эпилептиформной активности у крыс в модели височной эпилепсии. Применение функциональных нагрузок увеличивает выраженность различий между группами по данному показателю.

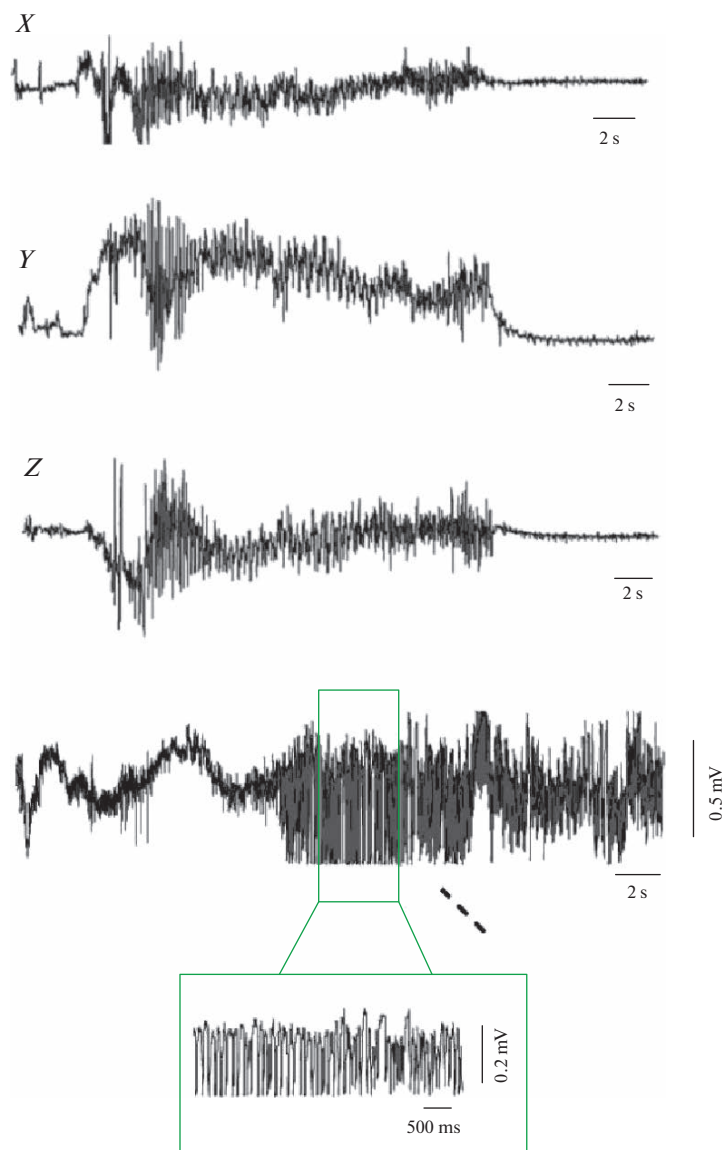
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе показано, что беспроводная методика регистрации ЭЭГ, а также функциональные нагрузки в виде РФФС и депривации сна могут быть успешно использованы для оценки эпилептиформной активности в хронической модели височной эпилепсии у крыс.

Особенностью предложенной модели регистрации ЭЭГ является то, что она позволяет проводить многодневные исследования ЭЭГ на свободно двигающейся крысе и при этом предотвратить развитие воспалительных процессов в мозге, вероятных при использовании вживленных электродов. Следует отметить, что неинвазивные методики редко используются при работе с экспериментальными моделями эпилепсии. Вероятно, это связано с трудностями в обеспечении надежного крепления электродов. Murthy Sindgi с соавт. предложили метод неинвазивной записи ЭЭГ, при котором электроды приклеиваются к коже головы крысы с помощью пластыря и клея [21]. Однако, используя такую конструкцию, трудно выполнить долговременную регистрацию свободно перемещающейся крысы. Гораздо чаще используется регистрация с помощью вживленных электродов [8–10]. Однако у этой методики есть существенный недостаток по сравнению с неинвазивной записью: риск нейровоспаления. Между тем, воспаление играет большую роль в формировании эпилептических изменений. Во-первых, сами по себе травмы мозга являются одним из факторов, повышающих риск развития эпилепсии [22], кроме того, провоспалительные факторы, в частности, бактериальный липополисахарид, усиливают последующее действие пилокарпина в хронической модели эпилепсии [23]. С другой стороны, применение противовоспалительной терапии — антагониста рецепторов провоспалительного цитокина интерлейкина- $1\beta$  (препарат анакинра) подавляет пилокарпин-индуцированный эпилептический статус [24] и последующее развитие психоневрологических нарушений [16]. Эти факты позволяют предполагать, что развитие воспалительных процессов, весьма вероятное при использовании вживленных электродов, может повлиять на выраженность эпилептиформной активности в моделях эпилепсии и привести к неправильным выводам.

Нейровоспаление играет большую роль в патогенезе не только эпилепсии, но и депрессивных расстройств [25], нейродегенеративных [2] и других нервных заболеваний. При работе с экспериментальными моделями таких нарушений периодически возникают задачи, требующие регистрации ЭЭГ, предложенный нами метод может быть успешно использован для их решения.

В данной работе нами также впервые в модели хронической эпилепсии исследовано действие сочетанных функциональных нагрузок — РФФС и депривации сна на показатели эпилептиформной активности. В качестве основного изучаемого показателя мы анализировали частоту интериктальных спайков. Данный показа-



**Рис. 4.** Показатели акселерометра ( $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ) и ЭЭГ (внизу) во время одного из эпизодов двигательных судорог у экспериментальной крысы.

тель является частым маркером эпилептических процессов. Частота интериктальных сайков позволяет предсказать успешность хирургического лечения больных с эпилепсией [26]. Она исследуется и в экспериментальных моделях эпилепсии, включая литий-пилокарпиновую [27]. В пилокарпиновой модели эпилепсии было показано, что частота спайков возрастает по мере развития эпилептических процессов [28].

Данные функциональные нагрузки широко используются в клинической диагностике состояния больных эпилепсией, однако они очень мало применяются в

экспериментальных исследованиях эпилепсии. Нам известно только одно исследование — Drinkenburg с соавт., в которой авторы показали, что у крыс эпилептической линии WAG/Rij в первые часы после депривации сна существенно увеличивались показатели эпилептиформной активности [29]. Результаты, полученные в настоящем исследовании, показывают, что применение функциональных нагрузок значительно усиливает эпилептиформную активность у литий-пилокарпиновых животных. Поскольку примененные нами воздействия позволяют значительно лучше дифференцировать контрольных и экспериментальных животных, подобный подход можно рекомендовать при проведении фармакологических исследований при поиске новых противоэпилептических средств.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/EU для проведения экспериментов на животных и одобрены Этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 1-8/2022 заседания №1 комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН от 27.01.2022).

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 21-15-00430.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.Е.З. и А.В.З.), разработка устройства (В.В.С.), сбор данных (Д.С.С, Г.А.Б), программа обработки данных (Д.В.А.), обработка данных (Д.С.С., Г.А.Б., О.Е.З., Д.В.А.), написание и редактирование манускрипта (Д.С.С., Г.А.Б, В.В.С., О.Е.З., Д.В.А., А.В.З.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Radtke FA, Chapman G, Hall J, Syed YA (2017) Modulating Neuroinflammation to Treat Neuropsychiatric Disorders. *Biomed Res Int* 2017: 1–21.  
<https://doi.org/10.1155/2017/5071786>
2. Calsolaro V, Edison P (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's Dement* 12: 719–732.  
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>
3. Jurcau A, Simion A (2021) Neuroinflammation in Cerebral Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injuries: From Pathophysiology to Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* 23: 14.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23010014>
4. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N (2017) Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology* 88: 296–303.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003509>
5. Fattorusso A, Matricardi S, Mencaroni E, Dell'Isola GB, Di Cara G, Striano P, Verrotti A (2021) The Pharmacoresistant Epilepsy: An Overview on Existant and New Emerging Therapies. *Front Neurol* 12: 1030.  
<https://doi.org/10.3389/FNEUR.2021.674483/BIBTEX>
6. Chen H, Koubeissi MZ (2019) Electroencephalography in Epilepsy Evaluation. *Contin Lifelong Learn Neurol* 25: 431–453.  
<https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000705>
7. Salami P, Lévesque M, Benini R, Behr C, Gotman J, Avoli M (2014) Dynamics of interictal spikes and high-frequency oscillations during epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 67: 97–106.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.03.012>

8. Kim JE, Cho KO (2018) The Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy and EEG Monitoring Using Radiotelemetry System in Mice. *J Vis Exp* e56831.  
<https://doi.org/10.3791/56831>
9. Castro OW, Santos VR, Pun RYK, McKlveen JM, Batie M, Holland KD, Gardner M, Garcia-Cairasco N, Herman JP, Danzer SC (2012) Impact of Corticosterone Treatment on Spontaneous Seizure Frequency and Epileptiform Activity in Mice with Chronic Epilepsy. *PLoS One* 7: e46044.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046044>
10. Wang S, Lévesque M, Avoli M (2019) Transition from status epilepticus to interictal spiking in a rodent model of mesial temporal epilepsy. *Epilepsy Res* 152: 73–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2019.03.005>
11. Kovács Z, Czúrkó A, Kékesi K, Juhász G (2011) Intracerebroventricularly administered lipopolysaccharide enhances spike–wave discharges in freely moving WAG/Rij rats. *Brain Res Bull* 85: 410–416.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.05.003>
12. Flink R, Pedersen B, Guekht AB, Malmgren K, Michelucci R, Neville B, Pinto F, Stephani U, Özkara C (2002) Guidelines for the use of EEG methodology in the diagnosis of epilepsy. *Acta Neurol Scand* 106: 1–7.  
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2002.01361.x>
13. Renzel R, Baumann CR, Poryazova R (2016) EEG after sleep deprivation is a sensitive tool in the first diagnosis of idiopathic generalized but not focal epilepsy. *Clin Neurophysiol* 127: 209–213.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.06.012>
14. Lévesque M, Biagini G, de Curtis M, Gnatzkovsky V, Pitsch J, Wang S, Avoli M (2021) The pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy: Over one decade later, with more rodent species and new investigative approaches. *Neurosci Biobehav Rev* 130: 274–291.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.08.020>
15. Vizuete AFK, Hansen F, Negri E, Leite MC, de Oliveira DL, Gonçalves C-A (2018) Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis. *J Neuroinflammation* 15: 68.  
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1109-5>
16. Dyomina AV, Zubareva OE, Smolensky IV, Vasilev DS, Zakharova MV, Kovalenko AA, Schwarz AP, Ischenko AM, Zaitsev AV (2020) Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection, and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy. *Pharmaceuticals* 13: 340.  
<https://doi.org/10.3390/ph13110340>
17. Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281–294.  
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
18. Sinton CM, Kovakkattu D, Friese RS (2009) Validation of a novel method to interrupt sleep in the mouse. *J Neurosci Methods* 184: 71–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.07.026>
19. Simonova VV, Guzeev MA, Ekimova IV, Pastukhov YF (2022) Chaperone Hsp70 (HSPA1) Is Involved in the Molecular Mechanisms of Sleep Cycle Integration. *Int J Mol Sci* 23: 4464.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23084464>
20. Wu T, Avidan AY, Engel J (2021) Sleep and Epilepsy, Clinical Spectrum and Updated Review. *Sleep Med Clin* 16: 389–408.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2021.02.011>
21. Murthy Sindgi V, Basani M, Choudary P, Molugu K, Malothu R (2019) Development of Non-invasive Electroencephalography Technique in Animal Model. *Indian J Pharm Educ Res* 53: s619–s623.  
<https://doi.org/10.5530/ijper.53.4s.157>
22. Fordington S, Manford M (2020) A review of seizures and epilepsy following traumatic brain injury. *J Neurol* 267: 3105–3111.  
<https://doi.org/10.1007/s00415-020-09926-w>
23. Sankar R, Auvin S, Mazarati A, Shin D (2007) Inflammation contributes to seizure-induced hippocampal injury in the neonatal rat brain. *Acta Neurol Scand* 115: 16–20.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00804.x>
24. Marchi N, Fan Q, Ghosh C, Fazio V, Bertolini F, Betto G, Batra A, Carlton E, Najm I, Granata T, Janigro D (2009) Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol Dis* 33: 171–181.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.002>
25. Troubat R, Barone P, Leman S, Desmidt T, Cressant A, Atanasova B, Brizard B, El Hage W, Surget A, Belzung C, Camus V (2021) Neuroinflammation and depression: A review. *Eur J Neurosci* 53: 151–171.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.14720>

26. Krendl R, Lurjer S, Baumgartner C (2008) Absolute spike frequency predicts surgical outcome in TLE with unilateral hippocampal atrophy. *Neurology* 71: 413–418.  
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000310775.87331.90>
27. Bajorat R, Goerss D, Brenndörfer L, Schwabe L, Köhling R, Kirschstein T (2016) Interplay between interictal spikes and behavioral seizures in young, but not aged pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsy Behav* 57: 90–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.01.014>
28. El-Hassar L, Milh M, Wendling F, Ferrand N, Esclapez M, Bernard C (2007) Cell domain-dependent changes in the glutamatergic and GABAergic drives during epileptogenesis in the rat CA1 region. *J Physiol* 578: 193–211.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.119297>
29. Drinkenburg WHIM, Coenen AML, Vossen JMH, van Luijckelaar ELJM (1995) Sleep Deprivation and Spike-Wave Discharges in Epileptic Rats. *Sleep* 18: 252–256.  
<https://doi.org/10.1093/sleep/18.4.252>

### A Minimally Invasive Method of Wireless Electroencephalogram Recording in Rats in a Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy

D. S. Sinyak<sup>a</sup>, G. A. Bukov<sup>a</sup>, V. V. Sizov<sup>b</sup>, O. E. Zubareva<sup>a</sup>,  
D. V. Amakhin<sup>a</sup>, and A. V. Zaitsev<sup>a,\*</sup>

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

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

\*e-mail: [aleksey\\_zaitsev@mail.ru](mailto:aleksey_zaitsev@mail.ru)

Recent studies have shown that neuroinflammation plays an important role in the pathogenesis of many nervous and mental diseases, such as cortical ischemia, craniocerebral trauma, neurodegenerative diseases, epilepsy, etc. Therefore, when recording EEG in experimental models of these diseases, it is preferable to use noninvasive recording methods to exclude neuroinflammation. However, such approaches are rarely used, since it is difficult to perform reliable EEG recording in animals without the use of implanted electrodes. In the present work a new device for minimally invasive wireless EEG recording in rats is proposed. The electrodes are located on the surface of the skull and are attached to a platform, which is fixed to the skull with screws. This design avoids damage to brain tissue. The surgery is minimally traumatic, and EEG registration can be performed as early as 2–3 days after surgery. High reliability of electrode attachment allows long-term registration. This method of EEG registration has been tested on a lithium–pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. EEG recordings in experimental and control rats were made under background conditions and with the use of functional loads — rhythmic photo- and phonostimulation, as well as sleep deprivation. It was shown that these functional loads allow increasing the severity of epileptiform manifestations on the EEG (spike frequencies), the maximum differences between the groups being manifested with a combination of the above loads. Thus, the main feature of the proposed EEG recording device is that it makes it possible to perform prolonged EEG studies on a free-moving rat without the development of possible neuroinflammation. This device can be used in experiments to study epileptogenesis and to test new antiepileptic drugs on experimental animals.

**Keywords:** EEG recording, epilepsy, intermittent photic stimulation, rhythmic auditory stimulation, sleep deprivation, ictal and interictal activity